



# Caractérisation d'arène dioxygénases impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *Mycobacterium* sp. 6PY1

Sylvain Kuony

## ► To cite this version:

Sylvain Kuony. Caractérisation d'arène dioxygénases impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques chez *Mycobacterium* sp. 6PY1. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00009997v2

**HAL Id: tel-00009997**

**<https://theses.hal.science/tel-00009997v2>**

Submitted on 2 Sep 2005

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I  
SCIENCES ET GEOGRAPHIE**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Sylvain KUONY**

Le 20 juin 2005

*Pour obtenir le titre de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I**

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 25 avril 2002)

Discipline : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

-----  
**CARACTERISATION D'ARENE DIOXYGENASES  
IMPLIQUEES DANS LA BIODEGRADATION DES  
HYDROCARBURES AROMATIQUES  
POLYCYCLIQUES CHEZ *MYCOBACTERIUM* SP. 6PY1**  
-----

Composition du jury:

Président :	M. D. SCHNEIDER
Rapporteurs :	Mme F. FAYOLLE-GUICHARD M. T. VOGEL
Examineurs :	M. S. KRIVOBOK
Directeur de thèse :	M. Y. JOUANNEAU

*Thèse préparée au sein du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés  
CNRS UMR5092*

*DRDC – Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble*







**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I  
SCIENCES ET GEOGRAPHIE**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Sylvain KUONY**

Le 20 juin 2005

*Pour obtenir le titre de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I**

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 25 avril 2002)

Discipline : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

-----  
**CARACTERISATION D'ARENE DIOXYGENASES  
IMPLIQUEES DANS LA BIODEGRADATION DES  
HYDROCARBURES AROMATIQUES  
POLYCYCLIQUES CHEZ *MYCOBACTERIUM* SP. 6PY1**  
-----

Composition du jury:

Président :	M. D. SCHNEIDER
Rapporteurs :	Mme F. FAYOLLE-GUICHARD M. T. VOGEL
Examineurs :	M. S. KRIVOBOK
Directeur de thèse :	M. Y. JOUANNEAU

*Thèse préparée au sein du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés  
CNRS UMR5092*

*DRDC – Commissariat à l'Energie Atomique de Grenoble*



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier M. Yves Jouanneau, mon directeur de thèse, directeur de recherches au CNRS, pour l'ensemble des connaissances qu'il m'a transmis, pour sa disponibilité ainsi que pour les compétences qu'il m'a permis d'acquérir.*

*Mes remerciements s'adressent également à M. Michel Satre, directeur de recherches au CNRS, qui m'a accueilli au sein du laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés qu'il dirige.*

*Je remercie aussi M. Dominique Schneider, professeur à l'université Joseph Fourier avec lequel j'ai découvert les activités de recherche et qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse.*

*Je remercie également Mme Françoise Fayolle-Guichard, ingénieur de recherche à l'Institut Français du Pétrole, et le M. Timothy Vogel, professeur à l'université Claude Bernard de Lyon, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Je remercie également Serge Krivobok, maître de conférences à l'université Joseph Fourier avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant cette thèse et qui m'a aussi fait l'honneur de juger ce travail.*

*J'adresse mes remerciements à Mme Christine Meyer, pour son aide dans la mise en œuvre de techniques de biochimie, pour ses petits conseils toujours utiles ainsi que sa gentillesse.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à M. John Willison pour son aide dans l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse ainsi que dans l'analyse de ces résultats.*

*Je tiens aussi à remercier l'ensemble du laboratoire BBSI notamment les stagiaires et doctorants, ainsi que Sandrine Demanèche pour les discussions et la bonne humeur qu'ils ont pu apporter et plus particulièrement Julien Gouré, Julien Micoud, Alexandrine, Emilie et Ophélie.*

*Je remercie enfin mon entourage familial et affectif dont le soutien m'a permis de mener ce travail à son terme.*





# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>5</b>
--------------------------	----------

<b>RESUME.....</b>	<b>7</b>
--------------------	----------

<b>Chapitre 1 – INTRODUCTION.....</b>	<b>9</b>
---------------------------------------	----------

<b>1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....</b>	<b>9</b>
A. Structures et propriétés.....	9
B. Origine.....	11
C. Toxicité des HAP.....	11
D. Techniques de dépollution.....	13
1. Procédés physiques.....	14
2. Procédés chimiques.....	14
3. Bioremédiation.....	15
<b>2. Biodégradation oxydative des HAP par les bactéries.....</b>	<b>17</b>
A. Biodégradation des HAP à 2 ou 3 noyaux aromatiques.....	17
B. Dégradation des HAP à 4 noyaux aromatiques ou plus : cas du pyrène.....	20
C. Génétique et régulation des enzymes de dégradation.....	22
D. Les dioxygénases.....	26
1. Les dioxygénases qui hydroxylent le noyau aromatique.....	27
2. Les dioxygénases qui clivent le noyau aromatique.....	28
3. La naphthalène dioxygénase : enzyme de référence.....	28
4. Mécanisme réactionnel de la naphthalène dioxygénase.....	31
<b>3. Isolement d'une souche bactérienne capable d'oxyder le pyrène.....</b>	<b>33</b>
A. Isolement.....	33
B. Etudes préliminaires de dégradation des HAP.....	34
C. Induction de protéines par le pyrène, le phénanthrène et le benzoate.....	37
<b>4. Objectifs de la thèse.....</b>	<b>41</b>

<b>Chapitre 2 – MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>43</b>
---	-----------

<b>1. Techniques de microbiologie et de génétique microbienne.....</b>	<b>43</b>
A. Souches et plasmides.....	43
B. Milieux et conditions de culture.....	43
1. Cultures de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1.....	43
2. Cultures de <i>E. coli</i> .....	43
3. Cultures de <i>Pseudomonas</i> .....	44
4. Cultures en fermenteur.....	45
5. Milieux.....	46
C. Conjugaison bactérienne entre <i>E. coli</i> et <i>Pseudomonas</i> .....	46

<b>2. Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>47</b>
A. Préparation d'ADN génomique de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1.....	47
B. Construction d'une banque d'ADN génomique de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1...	47
C. Amplification <i>in vitro</i> de fragments d'ADN (PCR).....	48
1. Mode opératoire.....	48
2. Criblage de clones recombinants par PCR sur colonies.....	49
3. Oligonucléotides.....	50
D. Préparation d'ADN plasmidique.....	50
E. Digestion enzymatique de l'ADN et purification de fragments.....	51
F. Ligation vecteur-insert .....	52
G. Marquage de sondes nucléiques à la digoxygénine (DIG).....	52
H. Détection d'ADN par hybridation de type Southern.....	52
I. Transformation bactérienne et sélection de clones recombinants.....	53
1. Préparation de cellules compétentes par traitement au CaCl <sub>2</sub> .....	53
2. Transformation par choc thermique.....	53
3. Criblage des transformants.....	53
4. Analyse des clones recombinants.....	54
J. Surexpression de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i> .....	54
1. Principaux systèmes de surexpression utilisés.....	54
2. Conditions d'expression.....	55
<b>3. Techniques de biochimie.....</b>	<b>57</b>
A. Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide.....	57
1. Préparation des échantillons protéiques.....	57
2. Préparation des gels de polyacrylamide et conditions de migration.....	57
B. Electrotransfert de polypeptides sur membrane.....	58
C. Révélation immunochimique.....	58
D. Dosage des protéines.....	59
E. Dosage de l'activité catalytique des dioxygénases <i>in vivo</i> .....	59
F. Préparation d'extraits de protéines de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1.....	60
G. Dosage de l'activité NADH oxydoréductase.....	60
<b>4. Techniques biophysiques et spectroscopiques.....</b>	<b>61</b>
A. Spectroscopie d'absorption UV-visible.....	61
1. Principe.....	61
2. Conditions d'obtention des spectres UV-visible.....	61
B. Chromatographie phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse (CPG-SM).....	62
1. Principe.....	62
2. Conditions expérimentales.....	62
3. Dérivation des dérivés hydroxylés des HAP.....	62

<b>Chapitre 3 – RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>65</b>
--	-----------

<b>1. Identification de trois dioxygénases.....</b>	<b>65</b>
A. Détection d'un gène de structure de dioxygénase dans le génome de la souche 6PY1.....	65
B. Construction d'une banque d'ADN génomique de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1...	67
C. Clonage des gènes <i>pdoB1A1</i> .....	67

D. Existence de plusieurs copies des gènes <i>pdoA1</i> et <i>pdoB1</i> dans le génome de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1.....	70
E. Détection et clonage des gènes codant pour une deuxième arène dioxygénase.....	71
1. Détection d'un gène de structure d'une deuxième arène dioxygénase.....	71
2. Isolement d'un clone de la banque d'ADN génomique possédant les gènes codant la dioxygénase Pdo2.....	72
F. Détection et clonage des gènes <i>pdoB3A3</i> codant une troisième arène dioxygénase.....	74
G. Analyse des séquences des gènes <i>pdo</i> .....	74
H. Discussion.....	75
1. <i>Mycobacterium</i> possède trois arène dioxygénases.....	75
2. Etude phylogénétique.....	80
3. Transporteurs d'électrons.....	82
<b>2. Propriétés catalytiques de Pdo1 et Pdo2.....</b>	<b>87</b>
A. Etude de l'activité de Pdo1.....	87
1. Construction de plasmides pour l'expression de Pdo1 dans <i>E. coli</i> .....	87
2. Influence de ferrédoxines et réductases hétérologues.....	88
3. Effet de la concentration d'inducteur sur l'activité de Pdo1.....	91
4. Effet de la température sur l'activité de Pdo1 <i>in vivo</i> .....	92
5. Sélectivité de Pdo1.....	94
B. Etude de l'activité de Pdo2.....	95
1. Construction de plasmides pour l'expression hétérologue de Pdo2.....	95
2. Influence de ferrédoxines et réductases hétérologues.....	96
3. Sélectivité de Pdo2.....	98
C. Discussion.....	99
<b>3. Surexpression et purification des composantes dioxygénases de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1.....</b>	<b>101</b>
A. Surexpression et purification de Pdo1.....	101
1. Surexpression de la dioxygénase Pdo1 et purification de la sous-unité $\alpha$ .....	101
2. Isolement de Pdo1 sous forme soluble.....	102
3. Caractérisation de Pdo1.....	103
4. Spectres UV-visible.....	103
B. Surexpression et purification de Pdo2.....	105
1. Isolement de Pdo2.....	105
2. Isolement de His <sub>6</sub> -Pdo2.....	106
3. Masse moléculaire et structure quaternaire de Pdo2.....	108
4. Spectres d'absorption UV-visible de Pdo2.....	108
C. Essai de purification de réductases de <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1.....	109
D. Purification de la composante ferrédoxine BphA3 de <i>Pseudomonas</i> sp. B4.....	111
E. Dosage de l'activité Pdo2 <i>in vitro</i> .....	112
F. Discussion.....	113
<b>4. Analyse de l'induction des dioxygénases dans <i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1 par Immunodétection.....</b>	<b>117</b>

<b>Chapitre 4 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....119</b>
---

<b>1. Conclusions.....</b>	<b>119</b>
A. Existence de multiples gènes d'arène dioxygénase chez <i>Mycobacterium</i> .....	119
B. Voies catalytiques du pyrène et du phénanthrène.....	120
C. Propriétés et sélectivité des dioxygénases Pdo1 et Pdo2.....	122
<b>2. Perspectives.....</b>	<b>124</b>
A. Etude structurale et fonctionnelles des arènes dioxygénases.....	124
B. Identification des transporteurs d'électrons associés.....	125
C. Régulation de l'expression des gènes cataboliques.....	125

<b>BIBLIOGRAPHIE..... 127</b>
-------------------------------

<b>ANNEXE..... 137</b>
------------------------

<b>SUMMARY.....153</b>
------------------------

## ABREVIATIONS

$\alpha$ -CTD	Domaine $\alpha$ C-terminal
BaP	Benzo[a]pyrène
BSA	Serumalbumine bovine
CFU	Unité formant colonie
CIAP	Phosphatase alcaline d'intestin de veau
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CSPD	Disodium 3-(4-methoxy-1,2,4-dioxetane-3,2-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1 <sup>3</sup> ,7]decan)-4-yl)phenyl phosphate
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DIG	Digoxygénine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxynucléotide 5' triphosphate
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FER	Ferrédoxine
FPLC	Chromatographie en phase liquide à basse pression
GFP	Green fluorescent protein
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HTH	Hélice-tour-hélice
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
ISP	Dioxygénase (Iron sulfur protein)
LB	Luria-Bertani
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBB	<i>n</i> -Butylboronate
NBT	Nitrobleu de tétrazolium
ORF	Cadre de lecture ouvert (open reading frame)
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PFU	Unité formant plaque
RED	Réductase
SDS	DocécyI sulfate de sodium
UV	Ultra-violet
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside



# RESUME





## RESUME

Cette thèse traite de la biodégradation par les bactéries d'une catégorie de polluants appelés hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP. La bactérie *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été isolée d'un sol pollué pour sa capacité à utiliser un HAP à 4 cycles, le pyrène, comme seule source de carbone et d'énergie. Pour comprendre comment le pyrène est métabolisé, l'identification des enzymes impliquées a été entreprise par une approche protéomique. Cette approche a notamment mis en évidence dans la souche 6PY1 deux arène dioxygénases, enzymes susceptibles de catalyser l'attaque initiale du pyrène.

L'objectif de cette étude consistait à cloner les gènes de structure des arène dioxygénases identifiées chez *Mycobacterium* 6PY1, à surexprimer ces gènes en système hétérologue pour faciliter la purification des enzymes correspondantes, et à déterminer les propriétés biochimiques et catalytiques de ces enzymes. Les gènes *pdoA1B1* codant la composante terminale d'une dioxygénase ont été clonés et surexprimés chez *E. coli*. Les propriétés catalytiques de cette enzyme, appelée Pdo1, ont été déterminées *in vivo* en dosant les produits d'oxydation de HAP composés de 2 à 4 cycles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). L'analyse de la sélectivité de l'enzyme, déterminée de cette façon montre que Pdo1 oxyde préférentiellement des HAP à 3 ou 4 cycles, comme le phénanthrène et le pyrène, mais n'attaque pas les di-aromatiques comme le naphtalène et le biphenyle. La protéine Pdo1 s'est révélée instable et n'a été purifiée que sous forme inactive.

Les gènes de structure d'une seconde composante dioxygénase ont été repérés dans un locus comportant deux autres gènes cataboliques. Les gènes *pdoA2B2* codent pour une enzyme, appelée Pdo2, montrant une spécificité étroite vis-à-vis des HAP à 2 ou 3 cycles aromatiques et une nette préférence pour le phénanthrène. La protéine Pdo2 purifiée est un hexamère de type  $\alpha_3\beta_3$ , possédant des centres [2Fe-2S] de type Rieske qui lui confèrent un spectre d'absorbance caractéristique. Des gènes susceptibles de coder pour une troisième dioxygénase ont été découverts dans le génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1. Ces gènes sont très proches en séquence de ceux codant pour Pdo1, suggérant que la bactérie synthétise deux iso-enzymes capables d'oxyder le pyrène. Le fonctionnement des arène dioxygénases requiert deux protéines transporteurs d'électrons

de type ferrédoxine et réductase. Celles qui sont associées aux enzymes Pdo1 et Pdo2 n'ont pas été identifiées. Cependant, l'activité des deux dioxygénases de la souche 6PY1 a été stimulée *in vivo* en co-exprimant dans *E. coli* des gènes accessoires recrutés d'autres bactéries. Enfin, des expériences d'immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques ont montré que les enzymes Pdo1 et Pdo2 sont co-induites en présence de HAP mais ne sont pas régulées de la même manière en fonction des conditions de croissance.

**Mots-clés** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), Biodégradation, *Mycobacterium*, Dioxygénase, Ferrédoxine, Réductase, Gènes *pdo*, Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

# INTRODUCTION



# CHAPITRE I : INTRODUCTION

## 1. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

### A. Structures et propriétés

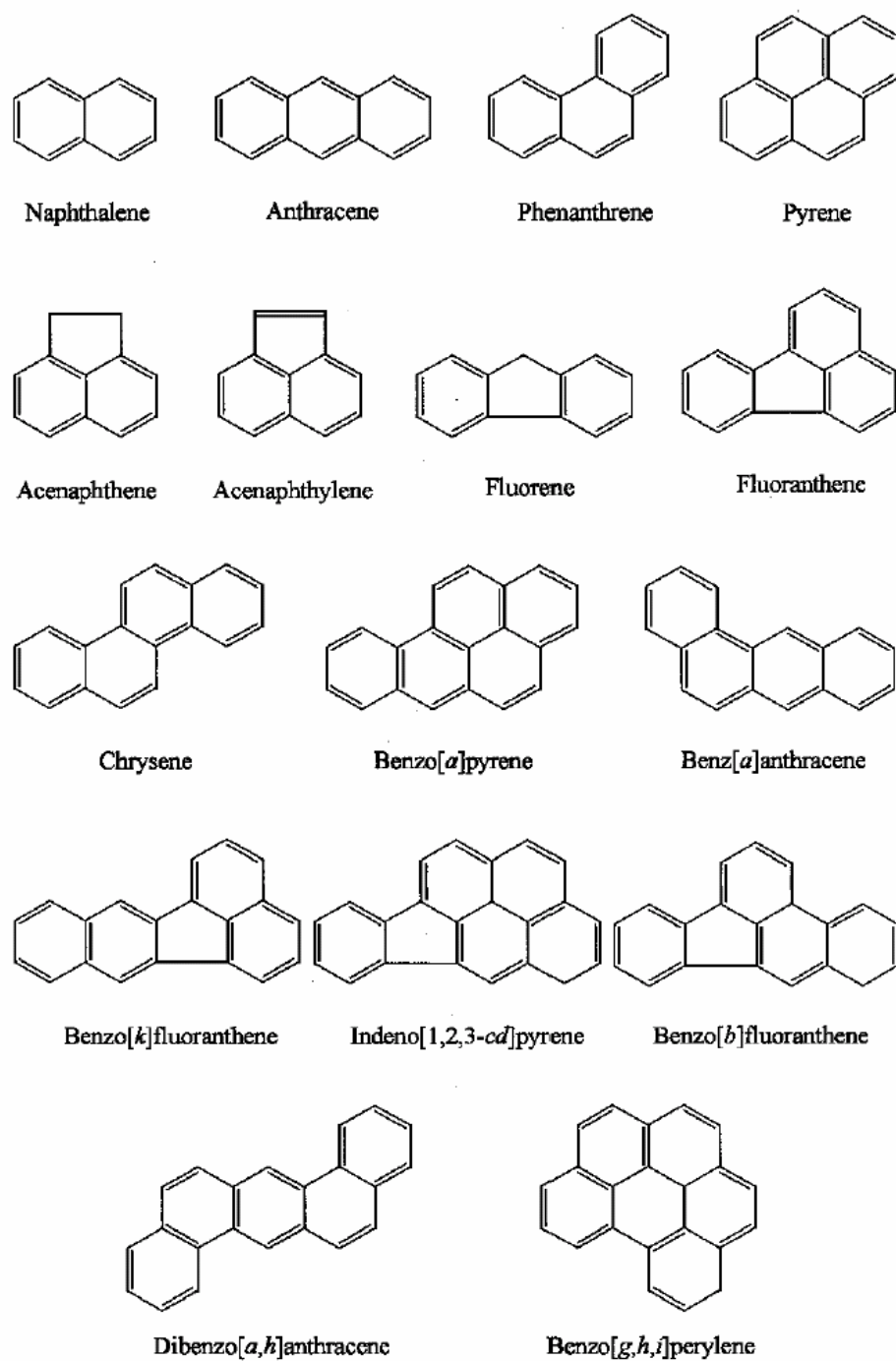
Les HAP sont des molécules composées d'au moins deux noyaux aromatiques accolés. Ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur agencement. Les structures de 16 HAP considérés comme polluants prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA) sont présentés Fig 1-1.

Les HAP sont très stables, peu volatils et hydrophobes. Les caractéristiques physico-chimiques de certains HAP sont détaillées dans le Tableau 1.1. Ces propriétés les rendent relativement résistants à la biodégradation. De fait, ils persistent dans l'environnement, faisant courir un risque sanitaire. En effet, des études ont montré que certains HAP sont génotoxiques, mutagènes et cancérigènes (Randerath *et al.*, 1999).

**Tableau 1.1** – Propriétés physico-chimiques des HAP selon Bouchez (1995)

HAP	Masse molaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité (mg/L)	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup>
Naphtalène	128,2	80	218	32	3,35
Acénaphthylène	152,2	82	270	3,93	
Acénaphthène	154,2	93	279	3,42	3,92
Fluorène	166,2	116	294	1,9	4,18
Phénanthrène	178,2	100	338	1	4,52
Anthracène	178,2	216	340	0,07	5,54
Fluoranthène	202	107	383	0,27	5,22
Pyrène	202	150	393	0,16	5,18
Chrysène	228,2	254	441	0,006	5,79
Benz[a]anthracène	228,2	156	435	0,0057	
Benzo[a]pyrène	252	179	496	0,0038	5,98

<sup>a</sup> Log Kow est le logarithme décimal du coefficient de partition Kow d'un composé dans un système standard octanol/eau.



**Figure 1-1 :** Structure et nomenclature des HAP, illustrées pour les seize HAP prioritaires de la liste de l'EPA

## **B. Origine**

Les HAP sont répartis de façon ubiquitaire dans l'environnement. Leur origine principale est l'utilisation et le transport des combustibles fossiles. Ainsi, la combustion incomplète de la matière organique fossile (charbon, pétrole et dérivés) ou plus récente (bois), ou pyrolyse, est une source majeure de HAP (Jouanneau *et al.*, 1999). A cela s'ajoute une production de HAP d'origine naturelle (incendies de forêts, volcans,...).

Les HAP sont omniprésents dans l'environnement : ils sont associés à des particules émises dans l'atmosphère, lesquelles se déposent provoquant une dispersion de la pollution. Ils sont également transportés par les eaux pluviales et fluviales et se retrouvent ainsi dans les boues de stations d'épuration. Les sols d'anciennes usines à gaz et de cokeries présentent une pollution aiguë par les HAP répartie de façon hétérogène entre des goudrons, des agrégats et des HAP adsorbés aux particules de sol (Tableau 1.2).

## **C. Toxicité des HAP**

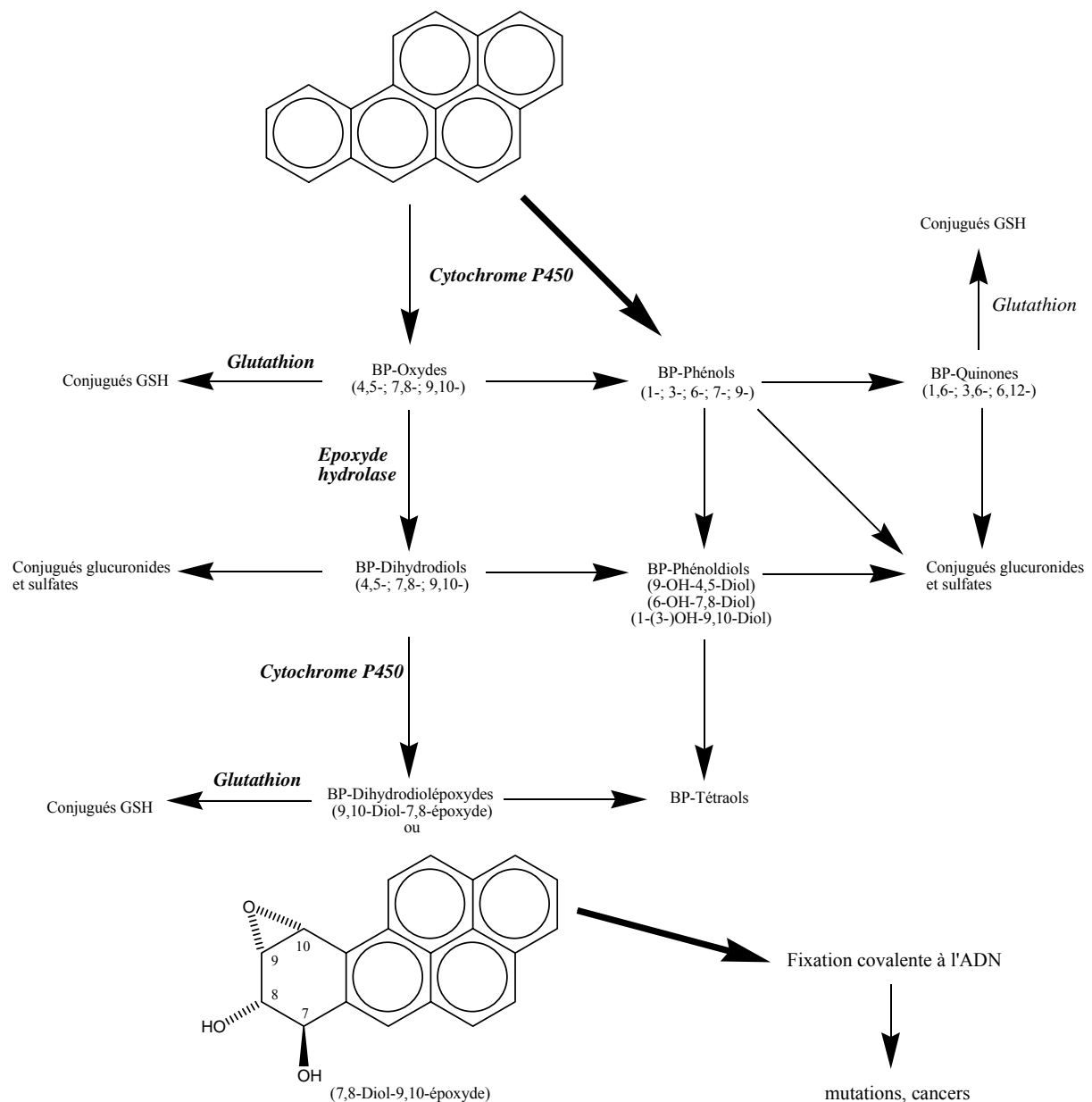
Les HAP se trouvent dans l'environnement à des doses relativement faibles, mais leur caractère hydrophobe entraîne leur bioconcentration dans la chaîne alimentaire. Certains ont été reconnus comme cancérogènes (benzo(a)pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène...). Chez l'homme, les HAP deviennent toxiques après oxydation enzymatique, provoquant la formation de métabolites électrophiles solubles. Ces métabolites peuvent alors former des adduits sur les acides nucléiques ainsi que sur les protéines, amenant à un dérèglement du processus de division cellulaire et à la formation de tumeurs (Szeliga et Dipple, 1998). Le benzo(a)pyrène (BaP) est certainement le plus connu et le plus étudié des HAP quant à sa cancérogénicité. Certains de ses dérivés seraient impliqués dans le développement de cancers du poumon chez l'homme par la formation d'adduits avec l'ADN, notamment au niveau du gène p53 (Denissenko *et al.*, 1996). Des études font état d'une plus grande mutagénicité de mélanges de HAP lorsque la proportion en BaP est plus importante (Randerath *et al.*, 1999).



**Tableau 1.2** – Composition en HAP de sols de sites industriels contaminés, d’après Wilson et Jones (1993)

Concentration (mg/kg) dans des échantillons provenant des sites :			
	Cokerie (1)	Cokerie (2)	Usine à gaz
Naphtalène	56	59	
Acénaphthylène		187	
Acénaphène		29	2
Fluorène	7	245	225
Phénanthrène	27	277	379
Anthracène	6	130	156
Fluoranthène	34		2174
Pyrène	28	285	491
Chrysène	11	135	345
Benzo[a]pyrène	14		92
Benz[a]anthracène	16	100	317
Benzo[b,k]fluoranthène			498
Dibenzo[ah]anthracène	2		2451
Indéno[1,2,3-cd]pyrène			207

Le BaP est transformé en une vingtaine de métabolites oxydés et un grand nombre de composés conjugués. L’oxydation initiale est réalisée par un monooxygénase de type cytochrome P450, enzyme présente dans tous les tissus des mammifères (Brookes, 1977). Une époxyde hydrolase transforme alors le produit en dihydrodiols, oxydés à leur tour en dihydrodiol-époxydes par un cytochrome P450. Ce sont ces dérivés du BaP qui se fixent de façon covalente à l’ADN ou aux acides aminés de protéines, formant ainsi des adduits lesquels sont à l’origine de cancers (figure 1-2) (IARC, 1983).



**Figure 1-2** - Métabolisme du benzo(a)pyrène dans des cellules de mammifères (IARC, 1983).

#### D. Techniques de dépollution

Du fait de leur caractère toxique et de leur présence en fortes concentrations dans certains sites pollués, il est important d'éliminer les HAP des milieux contaminés. Différentes solutions ont été proposées pour cela. Certaines des méthodes présentées ici sont plus détaillées dans l'étude sur les techniques de traitement par voie biologique des sols pollués (Ballerini *et al.*, 1998).

## 1. Procédés physiques

De nombreuses techniques de dépollution des sols par traitement physique existent avec leurs contraintes, leurs spécificités de polluants et de sols.

L'injection d'air ou de vapeur, ou *stripping*, permet d'extraire les solvants chlorés ou les produits organiques volatils en injectant de l'air ou de la vapeur sous pression directement dans le sol par des puits d'injection. Les polluants sont ainsi évaporés puis récupérés par des puits d'extraction. Le stripping a été utilisé pour la décontamination de sols pollués par les HAP (Costes et Druelle, 1997).

La *flottation* est une technique couvrant une large gamme de polluants dont les HAP. Après avoir excavé le sol, de l'eau et des agents tensioactifs sont ajoutés. L'injection d'air dans ce mélange entraîne l'emprisonnement des polluants qui remontent à la surface et forment une écume flottante qui est aisément récupérée puis traitée (Costes et Druelle, 1997).

Le *lavage* est une méthode bon marché et rapide avec un rendement supérieur à 80%. Elle consiste à séparer les polluants du sol par injection d'eau. Elle est, en général, associée à une autre méthode comme un traitement biologique ou une injection d'air ou de vapeur. Cette méthode a déjà été utilisée sur les HAP (Costes et Druelle, 1997).

La *désorption thermique* se fait sur des sols pollués par matières organiques facilement oxydables ; c'est le procédé physique le plus couramment utilisé actuellement pour la dépollution des sols contaminés par des HAP. Après excavation et broyage du sol, celui-ci est tamisé avant de subir le traitement thermique : injection d'oxygène (1000°C) ou four étanche (600-800°C). Enfin, les gaz d'extraction sont traités.

## 2. Procédés chimiques

Ces procédés sont généralement couplés à des procédés physiques. L'*extraction par solvant* permet d'enlever de nombreux polluants (les polluants doivent être solubles dans le solvant utilisé : alcanes, alcools, cétones). Ils sont introduits dans le sol où ils permettent l'extraction des polluants en les solubilisant (Chu et Kwan, 2003). Plusieurs méthodes d'extraction sont possibles : séparation naturelle et stripping, vaporisation (la

pression est diminuée jusqu'à atteindre la pression de vapeur saturante) ou la modification de température afin de rendre le solvant non-miscible à l'eau. L'utilisation des solvants présente l'inconvénient de laisser des restes de ces solvants, eux-mêmes toxiques.

Les procédés chimiques doivent être rigoureusement testés afin de déterminer la quantité de réactif à utiliser, et éviter qu'il se trouve en défaut ou en excès. Il est primordial de bien connaître les propriétés des sols afin d'éviter les risques de réactions secondaires qui mèneraient à la formation de nouveaux polluants.

### 3. Bioremédiation

C'est la technologie la plus « écologique ». Elle repose sur l'utilisation d'organismes ou micro-organismes afin de dégrader ou d'extraire les polluants du sol.

Le traitement en réacteur, ou **bioslurry**, consiste à créer une boue épaisse en mettant le sol en suspension avec de l'eau et des microorganismes. La biodégradation est alors stimulée par oxygénation et apport de nutriments. Cette technique s'applique particulièrement aux sols difficiles à traiter et aux substances peu biodégradables (Ballerini *et al.*, 1998). En effet, elle permet un contrôle plus efficace des conditions de la biodégradation (homogénéisation, chauffage, apports de nutriments...) ce qui entraîne une biodégradation accrue.

Le **landfarming** (Harmsen, 1991) repose sur l'épandage de terres contaminées sur des surfaces plus ou moins préparées à l'avance. Le site est contrôlé tant au point de vue de son nivellement qu'au niveau des eaux de ruissellement. Le pH est ajusté et une supplémentation azotée est réalisée afin de stimuler l'activité microbienne. Cette technique s'emploie principalement *ex situ*, mais également *in situ* sur une épaisseur ne dépassant pas 50 à 60 cm.

Le traitement biologique par aération du sol ou **bioventing**, fournit aux microorganismes présents dans le sol l'oxygène nécessaire à la biodégradation par injection d'air (Ballerini *et al.*, 1998).

Il est également possible d'injecter de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) qui est une source d'oxygène pour les bactéries. L'eau oxygénée et des nutriments sont injectés dans le sol, l'eau oxygénée en excès est récupérée par des puits de pompage.

La **phytoremédiation** consiste à utiliser des plantes pour le traitement de contaminants de l'environnement. Cette méthode est peu coûteuse et applicable à la restauration des sites et au traitement des eaux contaminées par des composés organiques. Les plantes adsorbent, accumulent ou volatilisent ces composés, elles augmentent également l'activité microbiologique de la rhizosphère dans le sol. La rhizosphère est particulièrement impliquée dans la dégradation des HAP (Newman et Reynolds, 2004). Dans ce cas, l'apport de la phytoremédiation devient difficile à étudier du fait des interactions entre sol, plantes, rhizosphère et micro-organismes. Néanmoins, des expériences ont montré une augmentation de la dégradation de pyrène en présence de plantes. Des études récentes, menées au laboratoire, ont montré que les plantes distribuent de l'oxygène au niveau de la rhizosphère, augmentant ainsi l'activité bactérienne de dégradation du pyrène (Jouanneau *et al.*, 2005).

## **2. BIODEGRADATION OXYDATIVE DES HAP PAR LES BACTERIES**

Certaines bactéries sont capables d'utiliser les HAP comme unique source de carbone et d'énergie (Churchill *et al.*, 1999, Dean-Ross et Cerniglia, 1996, Demanèche *et al.*, 2004). L'étude de la biodégradation des HAP par des souches bactériennes isolées à partir de sols contaminés a permis d'établir des voies métaboliques de dégradation, d'analyser l'organisation et la régulation des gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans la dégradation (Armengaud *et al.*, 1998, Saito *et al.*, 2000) ainsi que d'identifier et caractériser ces enzymes (Carredano *et al.*, 2000, Ensley et Gibson, 1983). Ces informations sont essentielles avant de se pencher sur ce qui se passe dans les sols contaminés.

On distingue la dégradation des HAP de « faible poids moléculaire », de 2 ou 3 noyaux aromatiques, des HAP de « haut poids moléculaire » pour lesquels le nombre de noyaux aromatiques est supérieur ou égal à 4. En effet, les enzymes impliquées dans la dégradation de ces deux types de HAP sont généralement différentes et peu d'informations sont disponibles sur les enzymes de dégradation des HAP de haut poids moléculaire. De plus, les bactéries isolées pour leur aptitude à dégrader les HAP de faible poids moléculaire sont souvent incapables de dégrader les HAP de plus de 3 noyaux aromatiques et réciproquement.

### **A. Biodégradation des HAP à 2 ou 3 noyaux aromatiques.**

La dégradation du naphthalène, HAP à 2 cycles accolés, est l'une des plus étudiée. De nombreuses souches ont été identifiées pour leur capacité à croître sur naphthalène comme seule source de carbone. C'est ainsi que des souches de *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Comamonas* et *Rhodococcus* ont été isolées (Fredrickson *et al.*, 1995, Goyal et Zylstra, 1996, Grund *et al.*, 1992, Simon *et al.*, 1993). La voie de dégradation du naphthalène a beaucoup été étudiée, notamment chez les espèces du genre *Pseudomonas* (Yen et Serdar, 1988). Elle est représentée sur la figure 1-3.

Le naphthalène est métabolisé en acide salicylique, lequel est converti en catéchol dans la plupart des bactéries. Le catéchol est alors clivé. Deux voies sont possibles : voie

*méta* (le catéchol est clivé en acide semialdéhyde 2-hydroxymuconique) ou la voie *ortho* (le catéchol est clivé en acide cis, cis-muconique). D'autres bactéries convertissent le salicylate en acide gentisique (acide 2,5-dihydroxybenzoïque)(Grund *et al.*, 1992).

La première étape de dégradation du naphthalène est catalysée par la naphthalène dioxygénase qui réalise la dihydroxylation de celui-ci pour former du *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphtalène. Cette enzyme a été purifiée (Ensley et Gibson, 1983) : il s'agit en fait d'un complexe enzymatique constitué d'une NADH-ferrédoxine réductase (RED), d'une ferrédoxine (FER), transférant les électrons de la réductase à une oxygénase terminale (ISP pour Iron Sulfur Protein)(Haigler et Gibson, 1990a, Haigler et Gibson, 1990b). La structure tridimensionnelle de la naphthalène dioxygénase de *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 a été établie (Kauppi *et al.*, 1998). Il a été montré que la naphthalène dioxygénase possède une spécificité très large : elle est capable d'oxyder le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène, le biphenyle, le dibenzothiophène, le dibenzofurane et l'acridine (Resnick et Gibson, 1996).

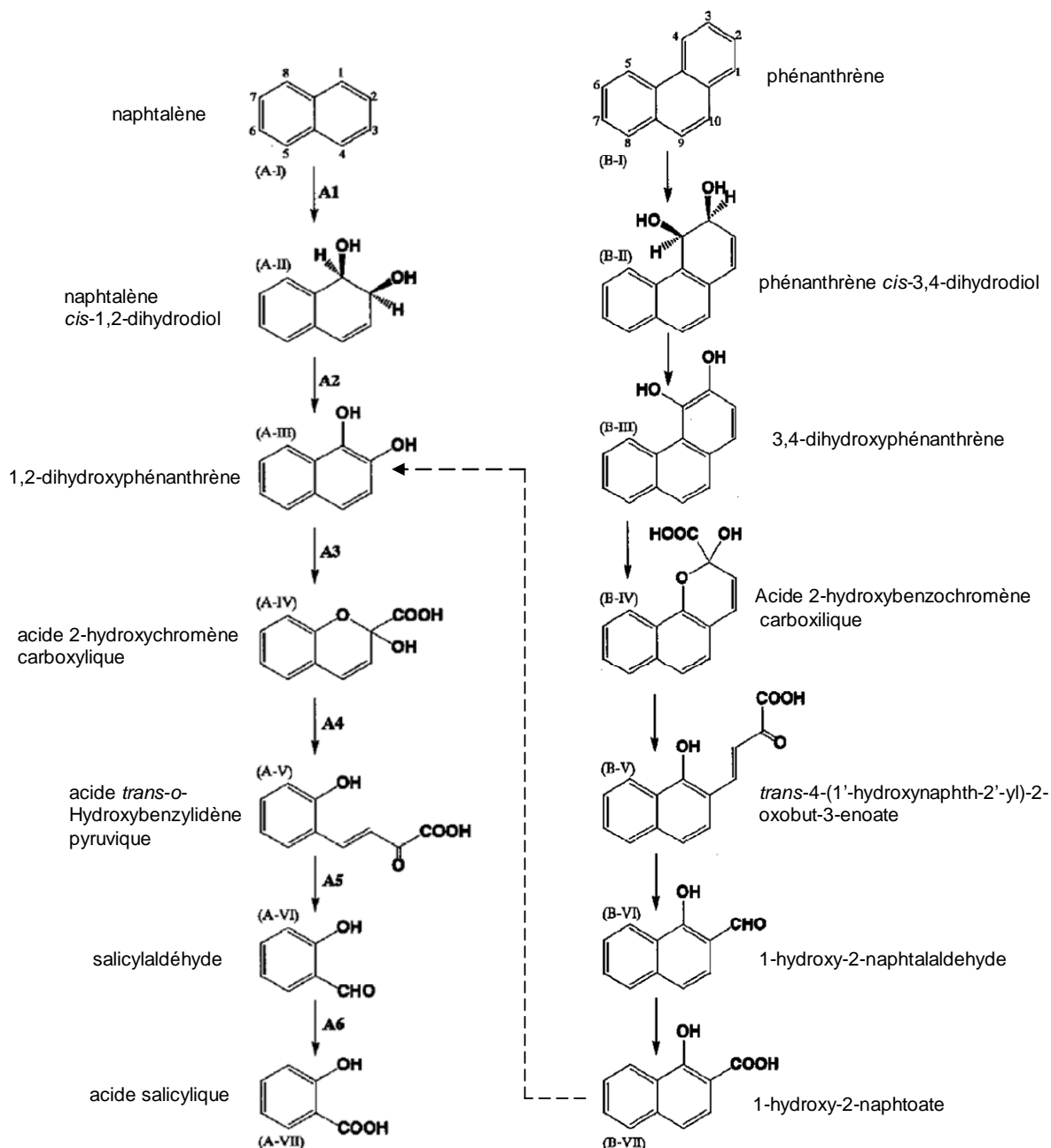
Les gènes codant pour les enzymes de dégradation du naphthalène sont portés sur des plasmides pour certaines bactéries (Yen et Gunsalus, 1982). Ces plasmides, transmissibles entre espèces, expliqueraient la propagation des gènes dans l'environnement. Certaines bactéries présentent une localisation différente de leurs gènes de dégradation du naphthalène : certains gènes sont localisés sur le chromosome alors que d'autres se trouvent sur un plasmide (Zuniga *et al.*, 1981).

Le produit de la réaction de transformation du naphthalène par la naphthalène dioxygénase est un dihydrodiol. Une déshydrogénase le convertit en 1,2-dihydroxynaphtalène. Celui-ci est alors le substrat d'une deuxième dioxygénase, pour être transformé en acide 2-hydroxychromène carboxylique lequel est converti en acide *trans*-*o*-hydroxybenzylidène pyruvique par une isomérase avant d'être clivé en salicylaldéhyde et pyruvate par une aldolase. Finalement, le salicylaldéhyde est converti en salicylate par une déshydrogénase.

De nombreuses espèces Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup> ont été décrites pour leur aptitude à croître sur phénanthrène (Kang *et al.*, 2003, Moody *et al.*, 2001, Story *et al.*, 2000). Beaucoup de bactéries capables de dégrader le naphthalène sont également capables de dégrader le phénanthrène, et dans ce cas les mêmes enzymes catalysent l'oxydation des deux substrats (Parales *et al.*, 2000).

La voie métabolique de dégradation du phénanthrène est présentée (figure 1-3). Deux voies sont possibles pour la dégradation du phénanthrène, selon les bactéries.

Dans une première l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque est oxydé en 1,2-dihydroxynaphtalène. Cette voie, propre aux bactéries Gram<sup>-</sup> comme celles du genre *Pseudomonas*, rejoint la voie de dégradation du naphtalène.



**Figure 1-3** – voies cataboliques proposées pour le naphtalène et le phénanthrène par des bactéries aérobies du genre *Pseudomonas*. Les enzymes impliquées sont :A1 naphtalène dioxygénase, A2 déshydrogénase, A3 extradiol dioxygénase, A4 isomérase, A5 aldolase, A6 salicylaldehyde déshydrogénase. Les mêmes enzymes catalysent les réactions homologues de la voie de dégradation du phénanthrène. Le 1-hydroxy-2-naphtoate rejoint la voie du naphtalène par l'action d'une hydroxylase.



Dans l'autre voie de dégradation du phénanthrène, l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque est oxydé en acide 2'-carboxybenzalpyruvique par une dioxygénase (Moody *et al.*, 2001). Cette voie est observée chez des bactéries Gram<sup>+</sup> telles que *Mycobacterium*, *Nocardioides*, ou *Aeromonas* (Moody *et al.*, 2001, Saito *et al.*, 1999). L'acide 2'-carboxybenzalpyruvique est transformé en 2-carboxybenzaldéhyde et pyruvate par une 2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase. Une deshydrogénase forme alors du phthalate à partir de ce dernier intermédiaire. La voie de dégradation du phthalate conduit alors à la transformation de celui-ci en 3,4-dihydroxybenzoate (figure 1-4) (Barnsley, 1983).

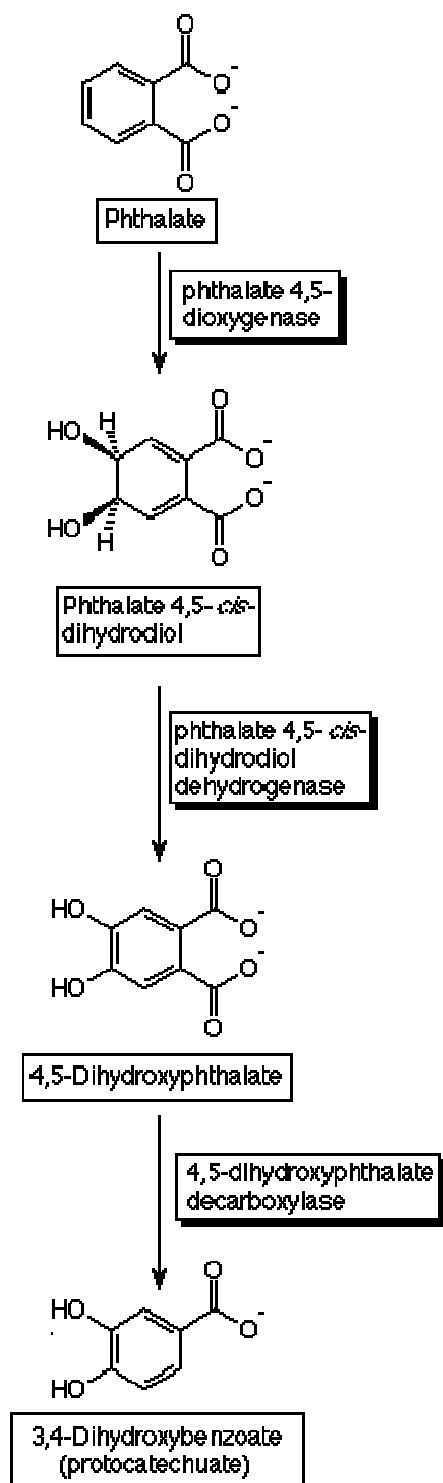
## **B. Dégradation des HAP à 4 noyaux aromatiques ou plus : cas du pyrène**

Alors que les HAP de 2 à 3 noyaux aromatiques sont relativement facilement dégradés par des bactéries, les HAP de haut poids moléculaire sont beaucoup plus récalcitrants à la biodégradation (Cerniglia, 1992, Wilson et Jones, 1993). La plupart des bactéries identifiées pour leur capacité de dégradation du pyrène sont des actinomycètes des genres *Mycobacterium* (Boldrin *et al.*, 1993, Schneider *et al.*, 1996), *Rhodococcus* (Bouchez *et al.*, 1995) ou *Gordonia* (Kastner *et al.*, 1994). Des espèces Gram<sup>-</sup> ont également été identifiées, comme *Pseudomonas fluorescens* (Boonchan *et al.*, 1998), *Sphingomonas paucimobilis* (Kastner *et al.*, 1998), ou *Burkholderia cepacia* (Juhász *et al.*, 1997).

Aucune des enzymes impliquées dans la dégradation du pyrène n'a été décrite excepté une dioxygénase capable d'oxyder le pyrène et le phénanthrène, identifiée dans la souche *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Khan *et al.*, 2001). Une séquence de 37 kb de cette bactérie a été obtenue (Figure 3-11, *Résultats et discussion*). Elle montre la présence de gènes de dégradation des HAP et du phthalate, ainsi que celle de gènes de transposases qui pourraient avoir été impliquées dans une réorganisation des gènes de la bactérie.

Des produits du métabolisme du pyrène ont été identifiés : il s'agit notamment du pyrène 4,5-dihydrodiol, de l'acide 4-phénanthroïque ainsi que du phénanthrène-4,5-dicarboxylate (Dean-Ross et Cerniglia, 1996, Heitkamp *et al.*, 1988, Schneider *et al.*,

1996). Des voies de dégradation du pyrène par différentes espèces de *Mycobacterium* ont été proposées (Cerniglia, 1992, Dean-Ross et Cerniglia, 1996, Kanaly et Harayama, 2000, Krivobok *et al.*, 2003).



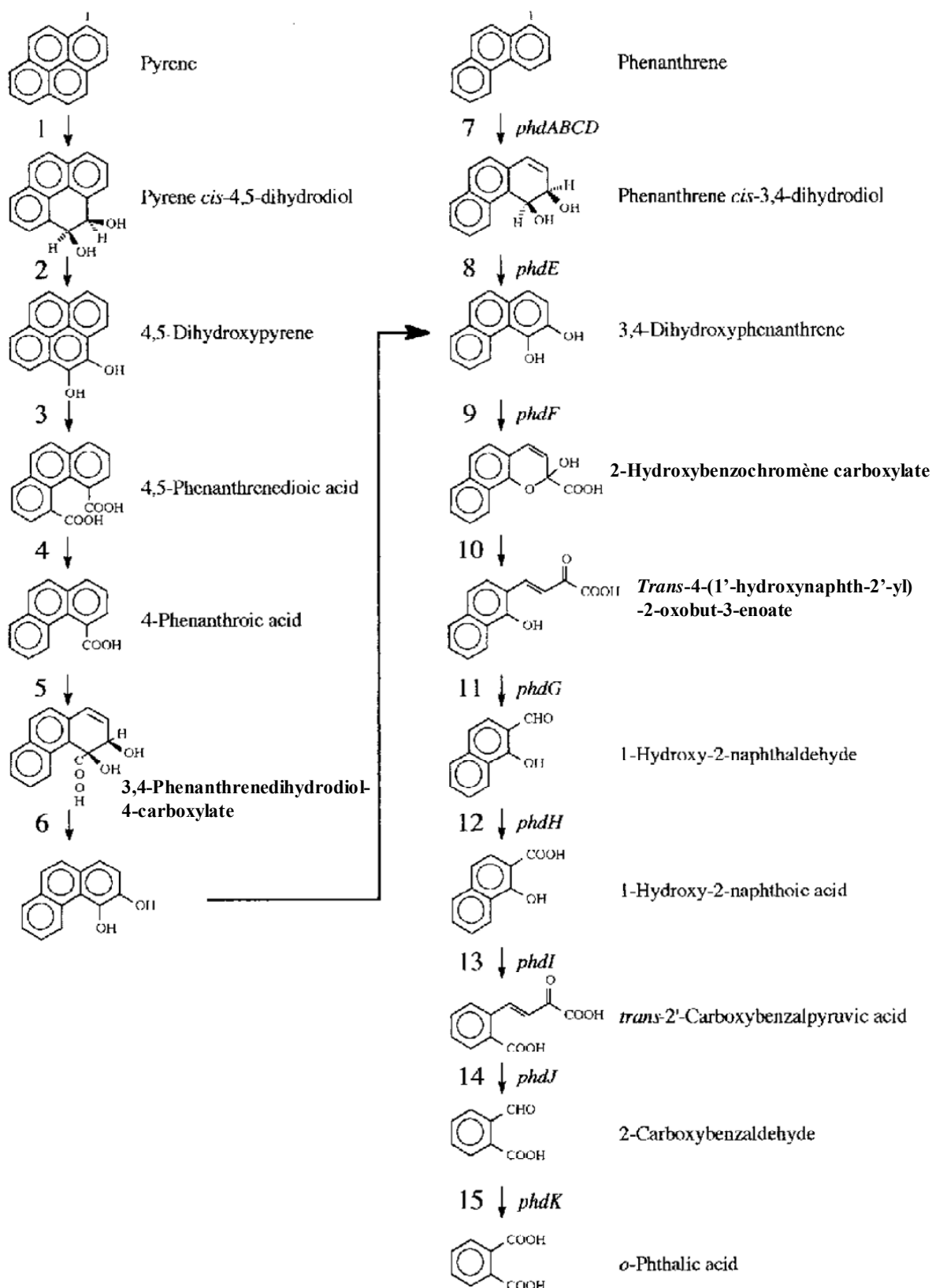
**Figure 1-4** Voie de dégradation du phthalate chez les bactéries du genre *Pseudomonas*

La dégradation du pyrène chez *Mycobacterium* rejoint celle du phénanthrène : un produit de dégradation du pyrène est le 3,4-dihydroxyphénanthrène, deuxième intermédiaire dans la dégradation du phénanthrène. Ainsi, sur 15 étapes de dégradation, seules six sont propres au pyrène, les neuf autres étant communes à la dégradation des deux HAP (figure 1-6).

Aucune souche bactérienne n'a encore été décrite pour sa capacité à croître sur un HAP dont le nombre de cycles aromatiques est supérieur à 4. Néanmoins, certaines souches sont capables de cométaboliser des HAP à 5 cycles aromatiques, comme le benzo[a]pyrène. C'est le cas de *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (Gibson *et al.*, 1975) et de *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Schneider *et al.*, 1996) qui sont capables de cométaboliser le benz[a]anthracène et le benzo[a]pyrène. Chez cette dernière bactérie, 3 voies de dégradation du benzo[a]pyrène ont été mises en évidence.

### **C. Génétique et régulation des enzymes de dégradation**

Les bactéries sont capables de s'adapter à leur environnement, notamment aux sources de carbone et d'énergie présentes dans leur milieu. Elles ont ainsi développé des systèmes leur permettant de réguler l'expression des gènes codant pour les voies du catabolisme des HAP (Tropel et Van Der Meer, 2004). La régulation de ces voies peut se faire grâce à un composé de la voie en question. La bactérie détecte la présence de ce composé à l'aide d'une protéine régulatrice. Cette protéine se fixe généralement dans la région promotrice de l'opéron cible, jouant le rôle d'activateur ou de répresseur de la voie de dégradation.

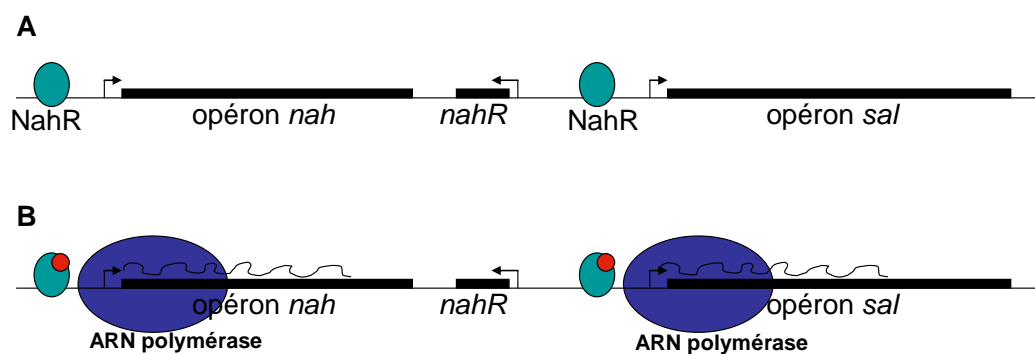


**Figure 1-6 :** Voie hypothétique de dégradation proposée pour le pyrène et le phénanthrène chez *Mycobacterium* (selon Krivobok *et al.*, 2003). Les enzymes impliquées sont 1: dioxigénase, 2: dihydrodiol déshydrogénase, 3:

intradiol dioxygénase, 4: décarboxylase, 5: dioxygénase, 6: déshydrogénase. Les enzymes *phd* se rapportent à leur homologue chez *Nocardioïdes* sp. KP7 (Saito *et al.*, 2000)

Les protéines régulatrices sont regroupées en familles selon leur structure, l'organisation de leurs promoteurs cibles ainsi que leur mécanisme d'action (Tableau 1-3). La famille la plus souvent rencontrée est celle des régulateurs transcriptionnels de type LysR (LTTR pour LysR Type Transcription Regulator). Au sein de cette famille, le régulateur NahR est certainement l'un des mieux caractérisés (You *et al.*, 1988).

Ce régulateur situé sur le plasmide pNAH7 de *Pseudomonas putida* contrôle les gènes *nah* qui codent la voie de dégradation du naphthalène et du salicylate chez cette bactérie (figure 1-7). Les gènes *nah* sont organisés en deux opérons : l'opéron *nah* est responsable de la dégradation du naphthalène en salicylate alors que l'opéron *sal* est à l'origine de la dégradation du salicylate (Yen et Gunsalus, 1982). NahR est capable d'interagir avec le salicylate pour induire la transcription de ces deux opérons. Pour cela, NahR possède un domaine de fixation au promoteur *nah* (présentant un motif hélice-tour-hélice HTH), un domaine de reconnaissance de l'inducteur (salicylate) ainsi qu'un domaine de multimérisation. L'inducteur des LTTR est en règle générale un intermédiaire de la voie de dégradation (Tropel et Van Der Meer, 2004).



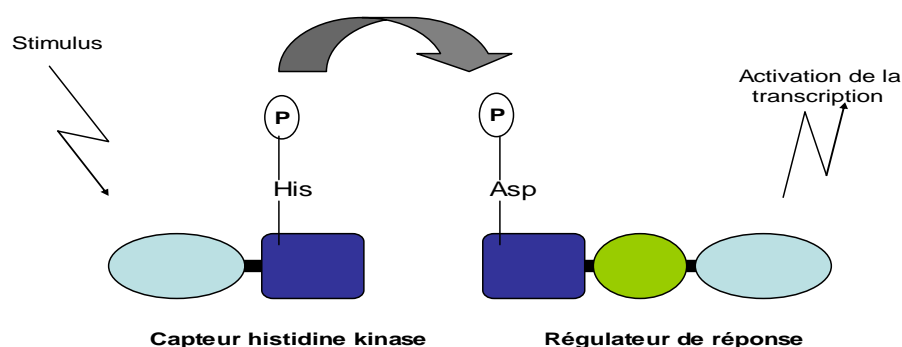
**Figure 1-7** - Représentation schématique du mode de régulation des gènes *nah* sur le plasmide pNAH7 en absence (A) ou en présence (B) de salicylate (rouge). Lorsque le salicylate produit par les enzymes de l'opéron *nah* se lie à la protéine régulatrice NahR, celle-ci interagit avec le domaine  $\alpha$ -CTD de l'ARN polymérase et déclenche la transcription.

**Tableau 1-3** Régulateurs de voies cataboliques de composés aromatiques

Famille et Protéines	Origine	Fonc. catabolique	Références
<b>Famille LysR</b>			
CatR	<i>Pseudomonas putida</i>	Catéchol	(Rothmel <i>et al.</i> , 1990)
CbnR	<i>Ralstonia eutropha</i>	3-chlorocatéchol	(Ogawa et Miyashita, 1999)
NahR	<i>Pseudomonas putida</i>	Naphthalène, salicylate	(You <i>et al.</i> , 1988)
BenM	<i>Acinetobacter</i> sp ADP1	Benzoate	(Collier <i>et al.</i> , 1998)
<b>Famille AraC/XylS</b>			
XylS	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>m</i> -toluate	(Spooner <i>et al.</i> , 1986)
BenR	<i>Pseudomonas putida</i>	Benzoate	(Cowles <i>et al.</i> , 2000)
<b>Famille XylR/DmpR</b>			
XylR	<i>Pseudomonas putida</i>	Toluène, <i>m</i> - et <i>p</i> -xylène	(Spooner <i>et al.</i> , 1986)
DmpR	<i>Pseudomonas</i> sp. CF600	Phénol	(Shingler <i>et al.</i> , 1993)
<b>Famille de transduction du signal à deux composants</b>			
TodS-TodT	<i>Pseudomonas putida</i>	Toluène	(Lau <i>et al.</i> , 1997)
BpdS-BpdT	<i>Rhodococcus</i> sp. M5	Biphényle – PCB	(Labbe <i>et al.</i> , 1997)

Il existe d'autres familles de protéines régulatrices telles que la famille AraC/XylS. Les régulateurs de cette famille sont la plupart du temps de activateurs de la transcription (Tropel et Van Der Meer, 2004). Enfin, des systèmes de transduction du signal à deux composants sont également impliqués (Tropel et Van Der Meer, 2004). Dans cette dernière famille, deux protéines sont nécessaires à la régulation : une histidine kinase, ayant le rôle de senseur, et un régulateur transcriptionnel. Un signal est perçu par le domaine N-terminal de l'histidine kinase qui catalyse alors la phosphorylation ATP-dépendante d'une histidine conservée de la protéine. Le groupe phosphoryl est transféré sur un résidu aspartate conservé dans la région N-terminale du régulateur de réponse associé. Ceci a pour résultat d'activer le régulateur qui peut déclencher la transcription des gènes du catabolisme (figure 1-5) (Tropel et Van Der Meer, 2004). La régulation de l'expression des protéines de dégradation du toluène par *Pseudomonas putida* F1 fait appel à un système à deux composants TodST. Ce système contrôle l'expression à partir du promoteur *todX* (Lau *et al.*, 1997). D'autres composés

aromatiques ont leur voie de dégradation régulée par des systèmes à deux composants : BpdST régule la voie de dégradation du biphenyle par *Rhodococcus* sp. M5 (Labbe *et al.*, 1997) ou encore StyRS qui régule la voie de dégradation du styrène (O'Leary *et al.*, 2002).



**Figure 1-5** Mécanisme général de fonctionnement d'un système à deux composants

Le gène *bphR* a été identifié sur le plasmide pNL1 de *Sphingomonas aromaticivorans* F199, une bactérie capable de dégrader plusieurs HAP dont le naphthalène (Romine *et al.*, 1999a, Romine *et al.*, 1999b). La protéine correspondante présente des similarités avec des régulateurs de type NtrC qui activent l'expression des gènes dont les promoteurs sont reconnus par une ARN polymérase à  $\sigma^{54}$ .

Aucun mécanisme de régulation de la transcription de gènes de dégradation de HAP de haut poids moléculaire n'a été identifié à ce jour, et très peu d'information est disponible sur la régulation du catabolisme chez les bactéries du genre *Mycobacterium*.

#### **D. Les dioxygénases**

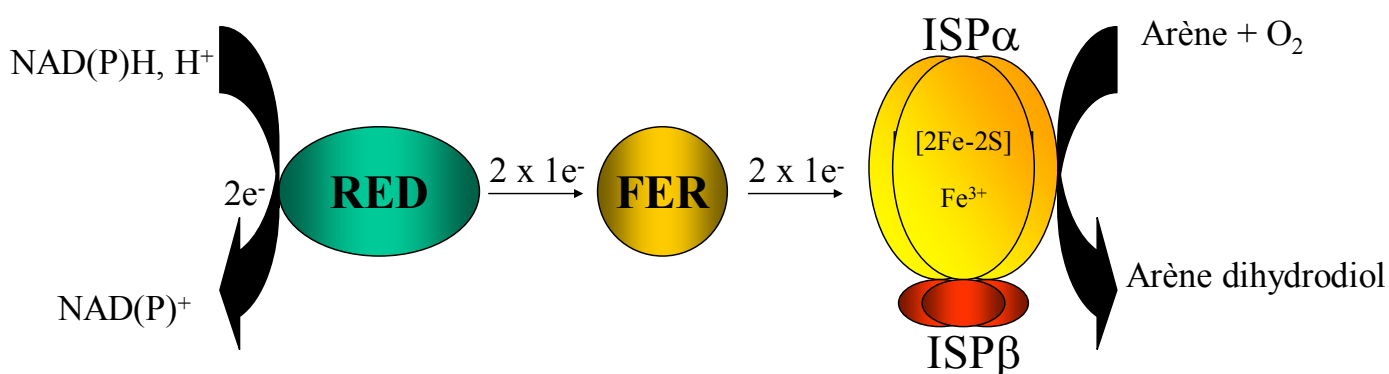
Chez les bactéries, la dégradation des HAP est rendue possible par deux étapes clés qui consistent en l'incorporation d'oxygène dans le noyau aromatique, permettant (i) l'activation et (ii) la fission du cycle aromatique. Ces deux opérations sont catalysées par des enzymes de type dioxygénase. Il existe deux type de dioxygénases : (i) celles qui hydroxylent le noyau aromatique et (ii) celles qui clivent le noyau aromatique (Butler et Mason, 1997, Harayama *et al.*, 1992).

## 1. Les dioxygénases qui hydroxylent le noyau aromatique

Ce type d'enzyme est également appelé hydroxylase. Il a été décrit pour la première fois par Gibson dans le cas de l'oxydation du benzène par *Pseudomonas putida* (Gibson *et al.*, 1968).

Les dioxygénases qui hydroxylent le noyau aromatique sont des métalloenzymes solubles à deux ou trois composantes. Ces complexes enzymatiques sont composés d'une ferrédoxine réductase, d'une ferrédoxine et de la dioxygénase proprement dite (fig. 1-7). Dans les complexes à deux composantes seules la ferrédoxine réductase et la dioxygénase sont présentes. La composante dioxygénase (également appelée oxygénase terminale ou encore ISP pour iron sulfur protein) est souvent un hétérohexamère constitué de trois sous-unités  $\alpha$  et de trois sous-unités  $\beta$ . Chaque sous-unité  $\alpha$  comporte un centre  $[2Fe-2S]$  de type Rieske, ainsi qu'un atome de fer mononucléaire au site catalytique. Peu d'informations sont disponibles sur le rôle de la sous-unité  $\beta$  lequel semble être uniquement structural (Butler et Mason, 1997).

L'hydroxylation du substrat est rendue possible grâce à l'activation de l'oxygène par une réduction à deux électrons : le NADH (ou le NADPH avec une efficacité moindre (Haddock et Gibson, 1995)) cède deux électrons à la réductase qui les transfère un par un à la ferrédoxine. Celle-ci les transporte alors à la dioxygénase qui catalyse ainsi la réaction de dihydroxylation (figure 1-8).



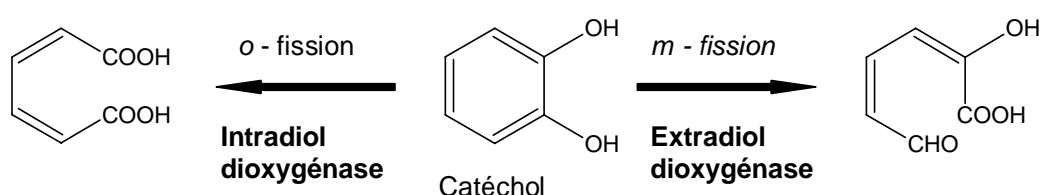
**Figure 1-8** : Schéma de fonctionnement des arène dioxygénases. La réductase (RED) obtient deux électrons de son cofacteur, qu'elle transmet un par un à la ferrédoxine (FER), laquelle les transporte à la dioxygénase ( $ISP\alpha\beta$ ) pour pouvoir activer l'oxygène et réaliser la réaction de dihydroxylation du substrat.



## 2. Les dioxygénases qui clivent le noyau aromatique

Ces enzymes sont classées selon le mode de fission du noyau aromatique qu'elles catalysent : intradiol dioxygénase lorsque la fission se fait en *ortho* (clivage entre les carbones porteurs des groupements hydroxyles) ou extradiol dioxygénase pour une fission en *meta* (clivage entre les deux carbones adjacents au diol) (figure 1-9). Ces deux type de dioxygénases constituent deux familles d'enzymes sans ressemblance au plan de la séquence en acides aminés. Elles diffèrent également par la valence de l'atome de fer situé au site actif : les intradiol dioxygénases présentent un fer ferrique alors que les extradiol dioxygénases possèdent un fer ferreux (Harayama *et al.*, 1992).

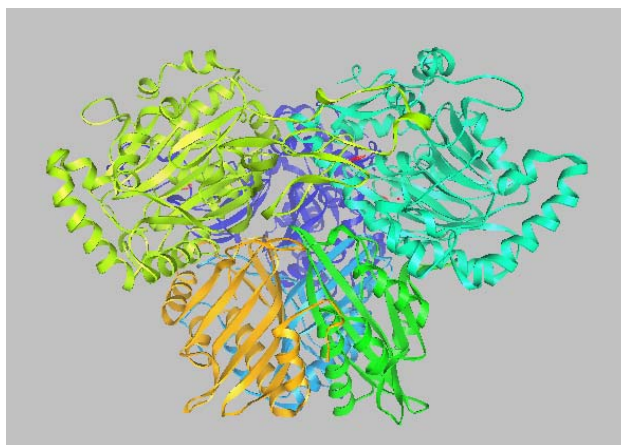
La première dioxygénase de ce type à avoir été séquencée est la catéchol 2,3-dioxygénase, codée par le gène *xylE* sur le plasmide TOL (Nakai *et al.*, 1983). Cette enzyme catalyse l'oxydation du catéchol en acide 2-hydroxymuconique semialdéhyde.



**Figure 1-9** : Les deux modes de clivage du noyau aromatique par les catéchol dioxygénases: o-fission pour fission en ortho; m-fission pour fission en meta

## 3. La naphtalène dioxygénase : enzyme de référence

La structure tridimensionnelle de la naphtalène dioxygénase a été résolue (Kauppi *et al.*, 1998). Elle a la forme d'un champignon, les sous-unités  $\alpha$  formant la coiffe et les sous-unités  $\beta$  formant le pied (figure 1-10).



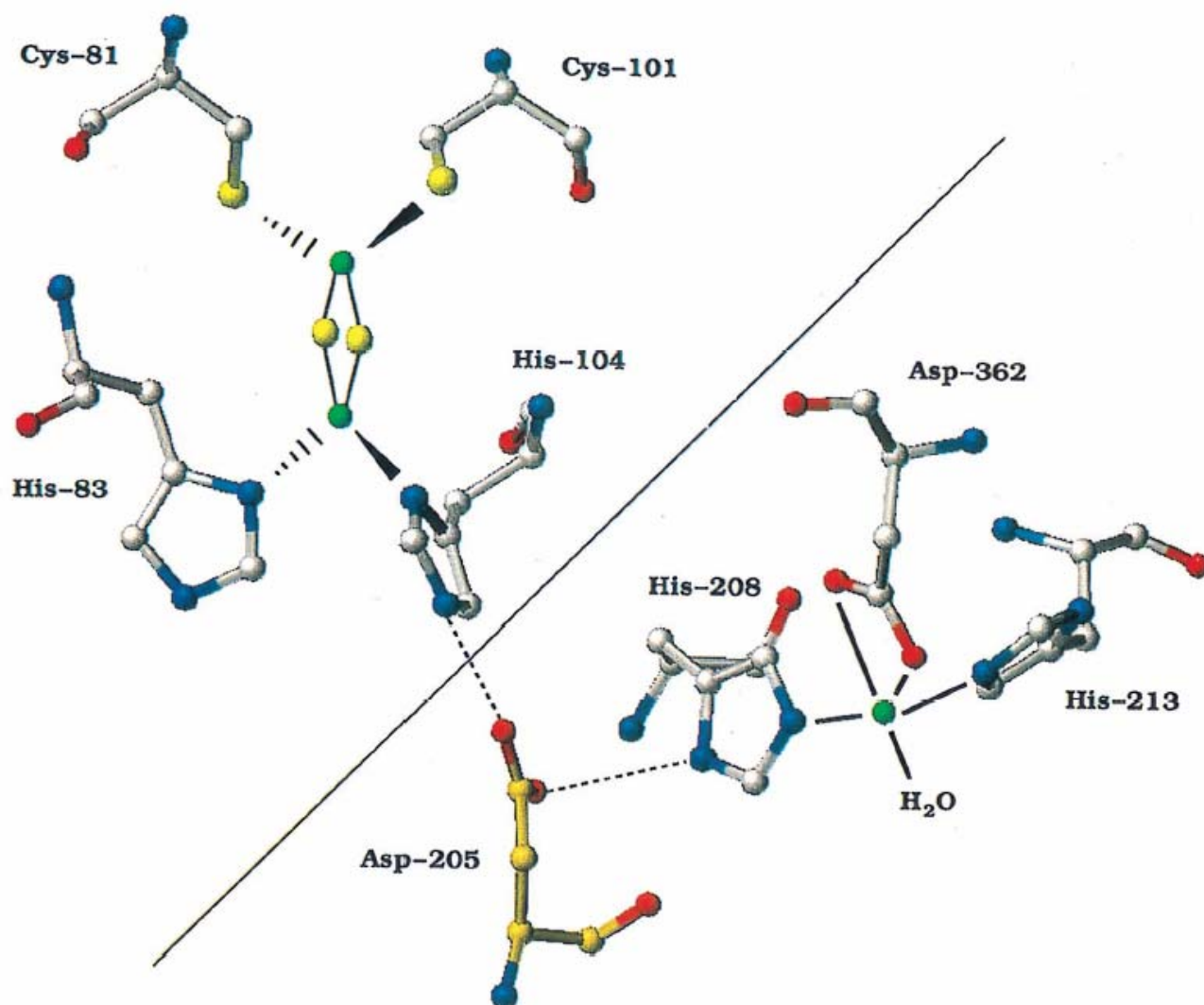
**Figure 1-10 :** Structure de l'hétérohéxamère  $\alpha_3\beta_3$  de la naphtalène dioxygénase. On retrouve la « coiffe » de sous-unités  $\alpha$  en haut (en vert pâle, bleu foncé et bleu), ainsi que le « pied » de sous-unités  $\beta$  dans la partie postérieure de l'enzyme (en orange, bleu, vert).

La sous-unité  $\alpha$  contient le centre  $[2Fe-2S]$ , coordonné au niveau des atomes de fer par les résidus Cys81 et Cys101 ainsi que par His83 et His104 (Kauppi *et al.*, 1998). La nature de ces acides aminés ligands indique que le centre fer-soufre est de type Rieske. En effet, les centres fer-soufre de type Rieske ont pour caractéristique d'être coordonnés par deux histidines pour l'un des atomes de fer et par deux cystéines pour l'autre (Rieske *et al.*, 1967). La sous-unité  $\alpha$  comporte aussi l'atome de fer mononucléaire, coordonné par His208, His213 et Asp362. L'atome de fer se trouve à une distance de 15Å de la surface. Les centres  $[2Fe-2S]$  de type Rieske des sous-unités  $\alpha$  se trouvent à proximité de l'atome de fer mononucléaire des sous-unités  $\alpha$  adjacentes. La distance entre le site catalytique et la sous-unité  $\beta$  la plus proche est trop grande pour que celle-ci joue un rôle catalytique (10Å). Cependant, selon les dioxygénases, l'implication de la sous-unité  $\beta$  reste controversé: les sous-unités  $\beta$  des toluate, toluène et biphenyl dioxygénase sont supposées intervenir dans la spécificité vis-à-vis du substrat (Ge et Eltis, 2003, Kimura *et al.*, 1997). D'autres études ont démontré que la sous-unité  $\alpha$  seule contrôle la spécificité vis-à-vis du substrat pour les benzène, 2-nitrotoluène et 2,4-dinitrotoluène dioxygénases (Maeda *et al.*, 2001, Zielinski *et al.*, 2002).

Les électrons seraient transférés du centre fer-soufre d'une sous-unité  $\alpha$  au site catalytique d'une sous-unité  $\alpha$  adjacente par l'intermédiaire de l'Asp205 de la sous-unité contenant le site catalytique (figure 1-11) (Parales *et al.*, 1999). Ces électrons permettent alors l'activation de l'oxygène et ainsi l'hydroxylation du substrat. Le substrat peut atteindre le site actif en empruntant un tunnel étroit bordé de résidus hydrophobes dont la partie supérieure est formée par deux boucles (Carredano *et al.*, 2000). Les résidus de

la poche de liaison du substrat ne sont pas conservés au sein des dioxygénases, ce qui est sans doute à l'origine des différences de spécificité au sein de cette famille d'enzymes. Pour la naphthalène dioxygénase, ces résidus sont au nombre de 17 (Carredano *et al.*, 2000). Le site catalytique de la dioxygénase se trouve enfoui dans cette cavité, dont le fond forme une région polaire. Des acides aminés de cette cavité ont été modifiés par mutagenèse dirigée (Parales, 2003, Parales *et al.*, 2000, Yu *et al.*, 2001). Il ressort de ces expériences que certains de ces acides aminés déterminent la nature et la configuration des produits de dihydroxylation. En effet, les dioxygénases catalysent des réactions très régio- et stéréospécifiques, par exemple la naphthalène dioxygénase produit quasiment exclusivement l'isomère *cis* 1R,2S-dihydroxy-1,2-dihydronaphtalène (Jeffrey *et al.*, 1975). Cette stéréospécificité est imposée par la structure de l'enzyme qui conditionne l'orientation du substrat au niveau du site actif. Ainsi le remplacement du résidu F352 par une valine a pour conséquence une inversion des proportions des isomères de biphenyle-dihydrodiols ainsi que de phénanthrène-dihydrodiols formés. En effet, cette mutation entraîne la formation d'une majorité de biphenyle 3,4-dihydrodiol ou de phénanthrène 1,2-dihydrodiol, produits minoritaires de la réaction catalysée par l'enzyme sauvage. De même, le produit formé par l'enzyme sauvage à partir du naphthalène, normalement énantio-pur à plus de 99%, se retrouve en proportion nettement inférieure, entre 92 et 96%. Ce résidu contribue vraisemblablement à l'orientation du substrat au niveau du site actif.

Au niveau du domaine Rieske, à proximité du centre [2Fe-2S], se trouve une dépression qui pourrait être le site d'interaction entre la dioxygénase et la férredoxine associée (Kauppi *et al.*, 1998). Ce site d'interaction ferait intervenir des résidus du domaine Rieske, du domaine catalytique mais aussi des résidus de la sous-unité  $\beta$ .

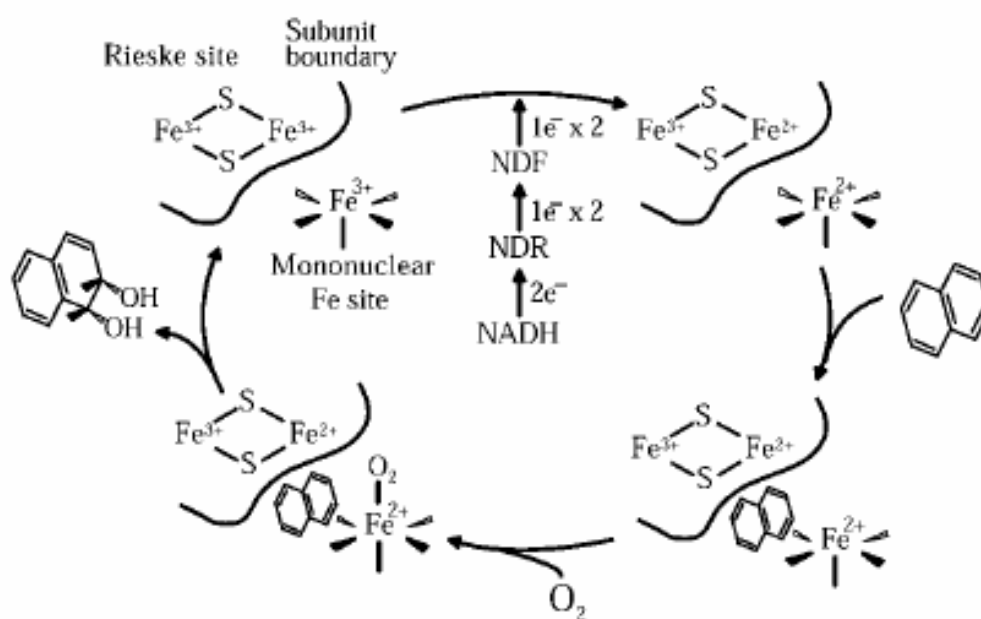


**Figure 1-11:** Structure du site actif de la naphthalène dioxygénase montrant un passage plausible des électrons entre le centre [2Fe-2S] et le fer mononucléaire de deux sous-unités  $\alpha$  adjacentes (Parales *et al.*, 1999).

#### 4. Mécanisme réactionnel de la naphthalène dioxygénase

Des études par cinétiques rapides et spectroscopie RPE ont porté sur le mécanisme réactionnel de l'enzyme (Karlsson *et al.*, 2003, Wolfe *et al.*, 2001). Le transfert des deux électrons permettant d'activer l'oxygène se fait un par un d'un centre [2Fe-2S] vers l'atome de fer mononucléaire du site catalytique. La fixation du substrat au site actif de l'enzyme précède celle de l'oxygène et rend l'enzyme réduite capable de réagir avec l'oxygène. Comme l'ont montré Karlsson *et al.*, 2003, le dioxygène se fixe en position latérale et non distale, comme c'est le cas pour les enzymes à hème de type cytochrome

P450. Dans cet état, les atomes d'oxygène deviennent fortement réactifs : ils réagissent alors avec le substrat, lequel se trouve à proximité du fer. Deux atomes de carbone adjacents d'un cycle aromatique forment simultanément des liaisons avec les atomes d'oxygène, transformant ainsi une double liaison carbone-carbone du cycle en une liaison simple (figure 1-12). L'hydrogène des groupements hydroxyles formés viendrait de molécules d'eau qui se trouvent en grand nombre dans la structure de l'enzyme.

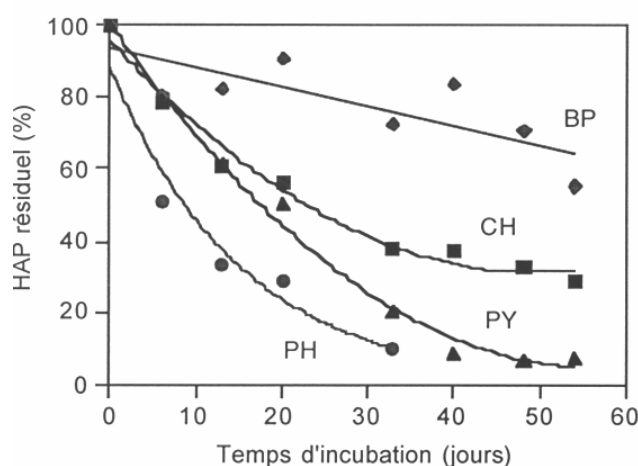


**Figure 1-12** : Représentation schématique de la réaction catalysée par la NDO, montrant l'état d'oxydation du centre [2Fe-2S] et de l'atome de fer mononucléaire au cours du cycle catalytique (Wolfe *et al.*, 2001).

### 3. ISOLEMENT D'UNE SOUCHE BACTERIENNE CAPABLE D'OXYDER LE PYRENE

#### A. Isolement

Au laboratoire, la dégradation des HAP par les micro-organismes a été testée dans un sol contaminé provenant d'une ancienne usine à gaz. Les cinétiques de dégradation du phénanthrène, du pyrène, du chrysène et du benzo-*a*-pyrène ont été suivies par dosage par HPLC, sur des cultures de 60 jours (figure 1-13). Les HAP légers tels que le phénanthrène ont été dégradés à plus de 50% en moins de 10 jours. Le pyrène atteignait ce taux de dégradation en deux fois plus de temps, alors que les concentrations de chrysène et de benzo[*a*]pyrène ont diminué beaucoup plus lentement. Ces résultats attestaient de la présence dans le sol contaminé de micro-organismes capables de dégrader le pyrène.

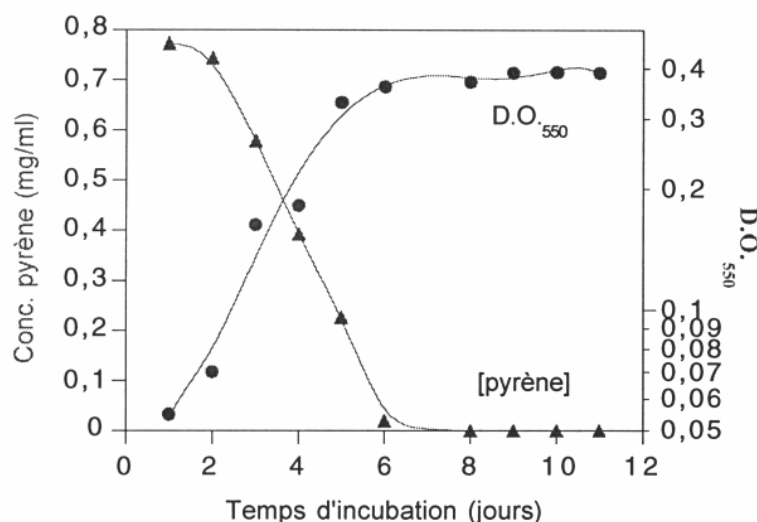


**Figure 1-13 :** Cinétiques de dégradation du phénanthrène (PH), du pyrène (PY), du chrysène (CH) et du benzo(a)pyrène (BP) par les micro-organismes présents dans des échantillons de sol contaminé.

Trois souches bactériennes ont été isolées pour leur aptitude à croître sur pyrène comme unique source de carbone et d'énergie. Le gène codant pour l'ARN 16S de chacune des souches a été amplifié par PCR et séquencé. Les trois séquences se sont révélées être identiques indiquant que les trois isolats appartenaient à la même espèce bactérienne. L'analyse phylogénétique indiquait que ces isolats, nommés 4PY, 5PY et 6PY appartenaient au genre *Mycobacterium*, l'espèce la plus proche étant *M. gilvum*.

## B. Etudes préliminaires de dégradation des HAP

Des cultures biphasiques en présence de pyrène ont été réalisées afin d'estimer les capacités de dégradation de chaque souche. Les cultures biphasiques consistent à mettre en présence deux phases non miscibles : une phase aqueuse où a lieu la croissance bactérienne et une phase huile contenant les HAP. Ces conditions de cultures ont été choisies pour favoriser l'accès des bactéries aux substrats peu hydrosolubles. La souche 6PY1 s'est montrée la plus stable et a donc été choisie pour l'étude biochimique des enzymes impliquées dans la biodégradation du pyrène (figure 1-14).



**Figure 1-14 :** Croissance sur pyrène de la souche *Mycobacterium* sp. 6PY1 en culture biphasique

L'aptitude de la souche 6PY1 à utiliser d'autres HAP que le pyrène comme source de carbone pour la croissance a été étudiée. D'autres substrats carbonés, aromatiques ou non, ont également été testés (Tableau 1-4).

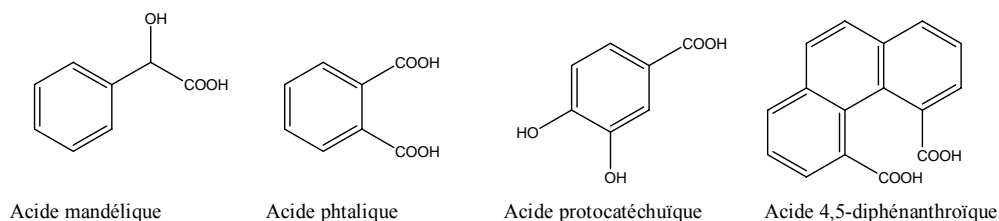
Le phénanthrène est le seul HAP que la souche 6PY1 a été capable d'utiliser comme substrat de croissance. Cette dernière a été plus rapide qu'avec le pyrène, puisqu'elle s'est fait en 2 à 3 jours contre 5 à 6 jours pour le pyrène. Sur le fluorène et le fluoranthène, le milieu de culture est devenu fortement coloré sans augmentation de la densité bactérienne, indiquant que ces HAP sont partiellement métabolisés par la souche 6PY1. Parmi les composés monocycliques testés, le benzoate et le cinnamate ont servi de sources de carbone, le benzoate étant le meilleur substrat.

Les métabolites intermédiaires de la minéralisation du pyrène par 6PY1 ont été recherchés. Un métabolite apparaissait dans la culture pendant la phase de croissance et disparaissait pendant la phase stationnaire. Ce métabolite a été purifié, puis identifié par des analyses de spectrométrie de masse et par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ ). Il s'agit de l'acide 4,5-diphénantroïque (composé 3 de la figure 1-6). Ce composé avait déjà été identifié dans des cultures sur pyrène de bactéries des genres *Mycobacterium* et *Rhodococcus* (Schneider *et al.*, 1996, Walter *et al.*, 1991). D'autres métabolites ont été identifiés à partir de cultures de plus grand volume, parmi lesquels les acides mandélique, phthalique et protocatéchuïque (figure 1-15).

Tableau 1-4 : Croissance de la souche 6PY1 sur différents substrats carbonés. +++ croissance en 24h ; ++ croissance en 3-4 jours ; + croissance > 7 jours ; (-) pas de croissance mais le milieu devient fortement coloré, indiquant que le substrat est métabolisé ; - pas de croissance au bout de 35 jours.

Substrat	Croissance
<i>HAP</i>	
Phénanthrène	++
Fluoranthène	(-)
Fluorène	(-)
Naphtalène	-
Acénaphène	-
Anthracène	-
Benz(a)anthracène	-
Chrysène	-
Benzo(a)pyrène	-
<i>Aromatiques simples</i>	
Benzoate	+++
Cinnamate	+
Phtalate	-
Protocatéchuate	-
Gentisate	-
Salicylate	-
Catéchol	-
<i>Non aromatiques</i>	
Acétate	+++
Succinate	-
Glucose	+

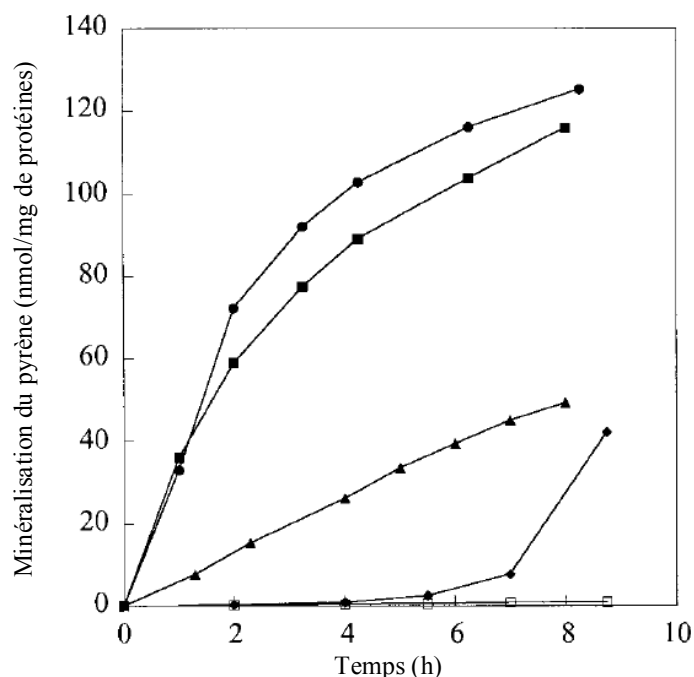




**Figure 1-15** –Structure des métabolites identifiés dans les cultures de *Mycobacterium* 6PY1.

La formation de pyrène 4,5-dihydrodiol, lequel serait à l'origine de l'acide 4,5-diphénanthroïque suggère que l'étape initiale dans la dégradation du pyrène par *Mycobacterium* sp. 6PY1 est catalysée par une enzyme de type dioxygénase.

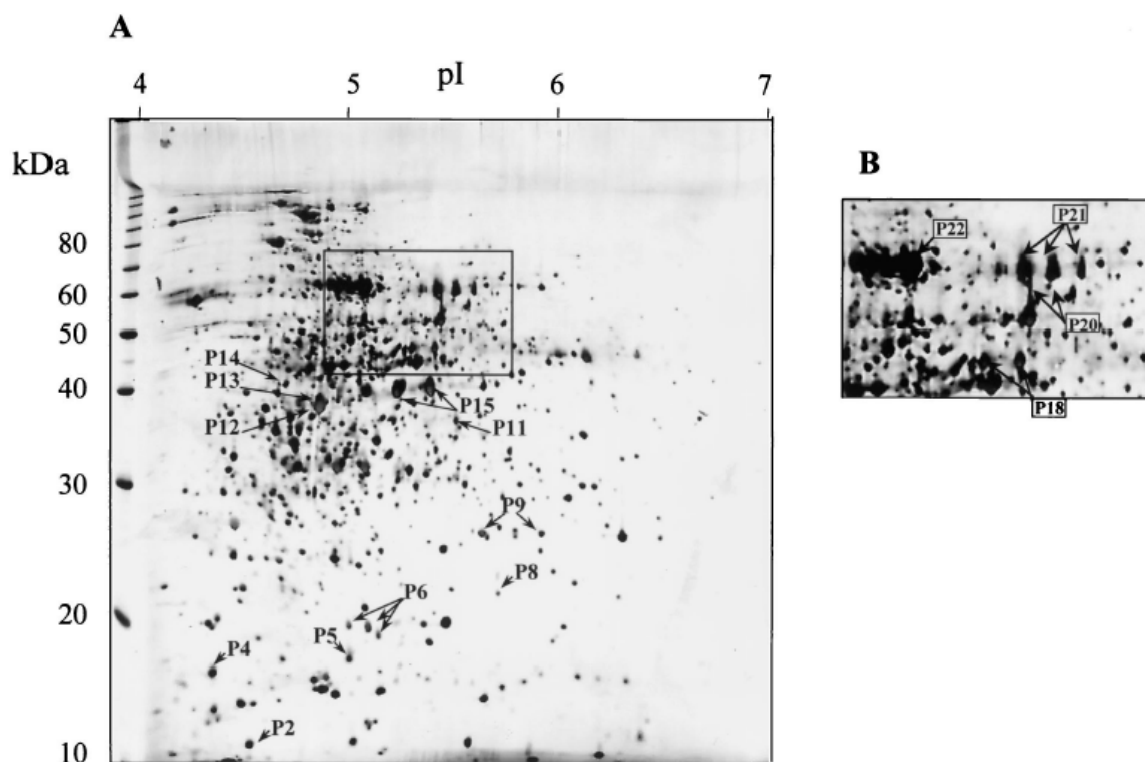
L'oxydation du pyrène par *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été suivie en mesurant la minéralisation du pyrène marqué au  $^{14}\text{C}$  après avoir cultivé la souche 6PY1 sur différents substrats : acétate, benzoate, phénanthrène ou pyrène. Une culture sur acétate en présence de pyrène a été exposée au chloramphénicol afin d'inhiber la synthèse protéique. Les résultats sont montrés figure 1-16. Les cultures ayant poussé sur pyrène ou sur phénanthrène ont une activité de minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -pyrène comparable, alors que l'oxydation du pyrène est plus lente dans les bactéries ayant eu le benzoate comme substrat. Les enzymes cataboliques qui dégradent le pyrène sont donc inductibles par le pyrène et le phénanthrène ; elles sont également induites par le benzoate à un niveau plus faible.



**Figure 1-16** – Minéralisation du pyrène au cours du temps par *Mycobacterium* sp. 6PY1 cultivée sur différentes sources de carbone : pyrène (■), phénanthrène (●), benzoate (▲), acétate (◆), acétate en présence de chloramphénicol (□) selon Krivobok *et al.*, 2003.

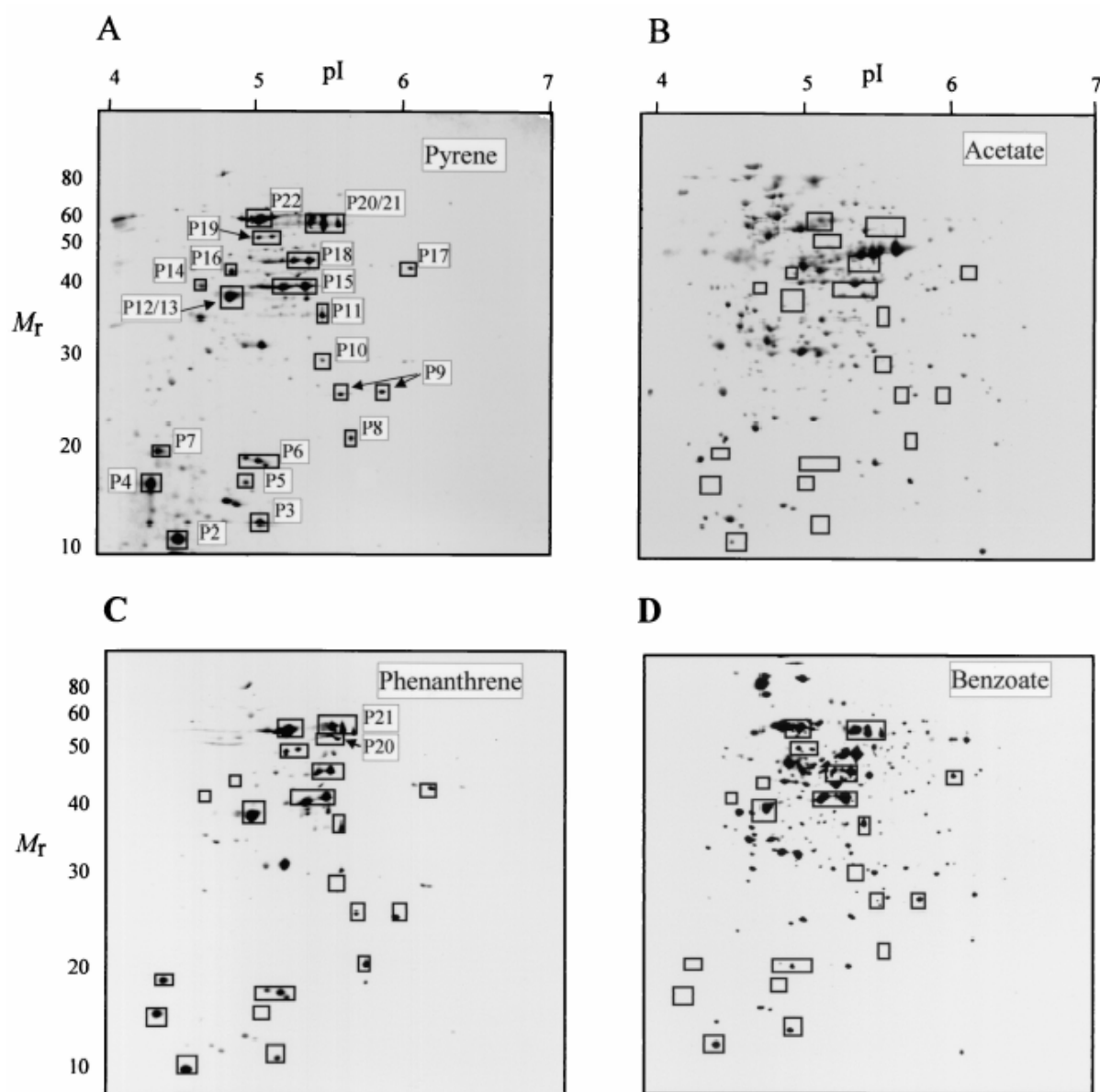
### C. Induction de protéines par le pyrène, le phénanthrène et le benzoate

Après avoir mis en évidence l'inductibilité des systèmes enzymatiques catalysant l'oxydation du pyrène, les polypeptides impliqués dans la biodégradation ont été recherchés par électrophorèse bidimensionnelle. La comparaison des extraits protéiques de la bactérie cultivée sur quatre substrats carbonés a permis d'identifier 22 polypeptides spécifiquement induits par le pyrène (figures 1-17, 1-18).



**Figure 1-17** - Analyse par électrophorèse 2D d'un extrait protéique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 cultivée sur pyrène (d'après Krivobok *et al.*, 2003).

Sur les 22 polypeptides détectés, onze ont été partiellement séquencés au niveau de leur partie N-terminale ou bien d'une région interne (Tableau 1-5). Parmi ceux-ci, certains ressemblent à des enzymes impliquées dans la biodégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques autres que le pyrène. C'est ainsi que des homologues des protéines PhdG, PhdH et PhdJ de l'opéron de biodégradation du phénanthrène par *Nocardioides* sp. KP7 ont été identifiés (Saito *et al.*, 2000). La protéine PhdG a été décrite comme une hydratase-aldolase alors que PhdH a été identifiée en tant qu'aldéhyde deshydrogénase. PhdJ est également une hydratase-aldolase, mais elle intervient plus en aval que PhdG dans la voie de dégradation du phénanthrène. Le polypeptide P8 présente de fortes homologies avec PhdB, la sous-unité  $\beta$  de la dioxygénase de l'opéron *phd* de la souche KP7 (Saito *et al.*, 2000). Une autre sous-unité  $\beta$  d'arène dioxygénase a été repérée. Celle-ci présente une très forte homologie de séquence avec la sous-unité  $\beta$  de la dioxygénase NidAB de *Mycobacterium vanbaleenii* sp. PYR-1 (Khan *et al.*, 2001).



**Figure 1-18 :** Analyse par électrophorèse bidimensionnelle des protéines néosynthétisées par 6PY1 en présence de différents substrats carbonés. Les cellules ont été incubées en présence d'un mélange de méthionine et de cystéine marquées au  $^{35}\text{S}$ . Après séparation des extraits protéiques par électrophorèse bidimensionnelle, les protéines radiomarquées ont été révélées par autoradiographie (selon Krivobok *et al*, 2003)

Tableau 1-5 : Analyse des séquences des polypeptides de 6PY1 induits par le pyrène ainsi que leur fonction possible déterminée par similarité de séquence. Les séquences N-terminales sont indiquées en italique. Les lettres entre parenthèses représentent des résidus dont la nature est incertaine. Les lettres entre crochets indiquent les résidus possibles à cette position dans la séquence.

Polypeptide	Séquence N-terminale ou interne du polypeptide	Meilleur homologue	% d'identité de séquence	Fonction possible
P1	<i>AIRFLTDDWATAVTDAANADERF(R)IAAKGH</i>	<b>ORF131</b> (AB031319)	<b>70</b>	<b>Inconnue</b>
P6	<i>N[AM][NV]AVDRD(R)(R)E</i>	<b>NidB</b> (AF249302)	<b>99</b>	<b>Sous-unité <math>\beta</math> d'arène dioxygénase</b>
P8	<i>VATVEQQLLLRCE(M)E</i> <b>KEYAWAED</b>	<b>PhdB</b> (AB031319) Résidus 85-91	<b>62</b>	<b>Sous-unité <math>\beta</math> d'arène dioxygénase</b>
P9	<i>TVDDQRTGRPMA</i>	<b>Aucun</b>		<b>Inconnue</b>
P12	<b>[L/I]YADAG[L/I]DxxKET[L/I]AYCR</b>	<b>ThtR</b> (O05793) (résidus 217-234)	<b>89</b>	<b>thiosulfate sulfurtransférase</b>
P13	<i>ARDDKLTSDDITGV</i> <b>[I/L]GELGADGLFVGR</b> <b>AA[L/I][K/Q][K/Q]R</b> <b>H[L/I]G[L/I][L/I]SGSAES..[L/I]R</b> <b>Xx[L/I]Q[L/I]DNA[Q/K]F[Q/K]AA</b>	<b>PhdJ</b> (D89988) Résidus 111-120 Résidus 194-199 Résidus 179-192 Résidus 278-288	<b>58</b>	<b>trans-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase</b>
P15	<i>TTRSELVPSDMKGLTGFVPA(A)STP</i>	<b>PhdG</b> (AB031319)	<b>72</b>	<b>Hydratase-aldolase</b>
P16	<i>MRAALAMKVGGKFEI</i>	<b>Aucun</b>		<b>Inconnue</b>
P18	<i>STAEISGLTEF</i> <b>MAG[L/I]AGSPYDVVG[L/I]R</b> <b>NALLFSVTLQPTLK</b>	<b>PhdI</b> (AB000735) Résidus 239-253 Résidus 333-346	<b>40</b>	<b>1-hydroxy-2-naphtoate dioxygénase</b>
P21	<i>QTETTEX(A)</i>	<b>NidA</b> (AF249301)	<b>98,5</b>	<b>Sous-unité <math>\alpha</math> d'arène dioxygénase</b>
P22	<i>MINANLIIDGREETS DRTIDV</i>	<b>PhdH</b> (AB031319)	<b>90</b>	<b>Aldéhyde déshydrogénase</b>

#### 4. Objectifs de la thèse

Lorsque j'ai entrepris ce projet de thèse, les travaux menés dans le laboratoire avaient conduit à l'identification par l'approche protéomique d'une vingtaine de polypeptides impliqués dans la dégradation des HAP. Des sous-unités constitutives de deux dioxygénases avaient notamment été mises en évidence.

Dans un premier temps, mon travail a consisté à cloner les gènes codant pour ces deux dioxygénases de façon à être en mesure de les surexprimer et d'obtenir ainsi ces enzymes sous forme recombinante. Au cours de ce travail, les gènes codant pour une troisième enzyme de type arène dioxygénase ont été découverts par criblage d'une banque d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1.

Dans un deuxième temps, il s'agissait de doser l'activité des enzymes recombinantes pour déterminer l'aptitude de chacune d'elles à oxyder les HAP et le pyrène en particulier. Pour cela, j'ai mis au point les conditions optimales d'expression des dioxygénases dans *E. coli*, puis j'ai effectué des cinétiques d'oxydation des HAP et j'ai analysés les produits formés par CPG-SM.

Au cours de cette étude, les dioxygénases seront purifiées ce qui permettra de déterminer les propriétés biochimiques, et à terme de connaître leurs propriétés cinétiques. Enfin, le volet de la régulation de la synthèse des dioxygénases chez *Mycobacterium* sp. 6PY1 sera sommairement abordé.



# **MATERIEL ET METHODES**





## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

### 1. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE ET DE GENETIQUE MICROBIENNE

#### A. Souches et plasmides

La souche *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été isolée d'un site contaminé par des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Elle a été sélectionnée pour sa capacité à croître sur pyrène comme unique source de carbone et d'énergie. Le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S ainsi que des tests sur galerie API ont permis d'identifier la bactérie comme appartenant au genre *Mycobacterium* et à l'espèce *gilvum*.

Les différentes souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude sont détaillés dans les tableaux 2-1 et 2-2).

#### B. Milieux et conditions de culture

##### 1. Cultures de *Mycobacterium* sp. 6PY1

Les cultures de *Mycobacterium* sp. 6PY1 ont été réalisées en aérobose à 25°C. Les cultures, en milieu liquide, ont été effectuées sous agitation rotative (200 tr/mn) en erlenmeyer. Nous avons utilisé le milieu MSM (Mineral Salts Medium) (cf. paragraphe 1.B.5) auquel était ajouté un substrat de croissance : acétate (50 mM), benzoate (5 mM), phénanthrène (0,5 g/L) ou pyrène (0,1 g/L).

##### 2. Cultures de *E. coli*

*E. coli* a été cultivée sur milieu riche (LB) contenant les antibiotiques aux concentrations suivantes : ampicilline 100 µg/mL (Ap100), kanamycine 20 µg/mL

(Km20), chloramphénicol 30 µg/mL (Cm30), tétracycline 10 ou 5 µg/mL (Tc10 ou 5), gentamicine 10 µg/mL (Gm10). Les cultures ont été réalisées à 37°C, en aérobiose assurée par agitation rotative pour les cultures en milieu liquide ; en étuve pour les cultures sur boîtes de Pétri.

En milieu biphasique, les HAP ont été dissous dans de l'huile de silicone; celle-ci étant ajoutée à du milieu M9 (Sambrook *et al.*, 1989) supplémenté en glucose (0,2 %) à un rapport 1:5.

**Tableau 2.1** – Souches bactériennes utilisées au cours de cette étude

Souches	Caractéristiques	Références
BL21 (DE3)[pLysS]	F <sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ(DE3) [pLysS Cm <sup>R</sup> ]	Novagen, Invitrogen
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ(DE3)	Novagen, Invitrogen
BL21 AI	F <sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) araB::T7RNAP-tetA	Invitrogen
XL-10 Gold Kan	Tet <sup>R</sup> Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(Tet <sup>R</sup> ) Tn5 (Kan <sup>R</sup> ) Amy]	Stratagene
XL-1 Blue MRF'	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]	Stratagene
DH5α	F <sup>-</sup> endA1 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>-</sup> ) supE44 thi-1 λ <sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 Δ(argF-lacZYA)U169 Φ 80d lacZΔM15	Invitrogen
TOP10	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)76-97 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen
SOLR	mcrA <sup>-</sup> Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan <sup>R</sup> ) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 λ <sup>R</sup> [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15] Su <sup>-</sup>	Stratagene
<i>Mycobacterium</i> sp.6PY1	Capable de croître sur pyrène et sur phénanthrène	Cette étude
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442	Rif <sup>r</sup> , mutant mt-2 (TOL <sup>-</sup> )	(Franklin <i>et al.</i> , 1981)

### 3. Cultures de *Pseudomonas*

La souche KT2442 de *Pseudomonas putida* a été cultivée sur milieu LB ou sur milieu M9. Les souches de *Pseudomonas* recombinantes ont été cultivées en présence des antibiotiques adéquats aux concentrations suivantes : Tc5 + Rifampicine 33 µg/mL (Rif 33).

**Tableau 2.2** – Plasmides utilisés au cours de cette étude

Plasmide	Caractéristiques	Référence
pHA171	Plasmide contenant <i>phdABCD</i>	(Saito <i>et al.</i> , 2000)
pET9a	Vecteur d'expression	Novagen
pET15b	Vecteur d'expression	Novagen
pDrive	Vecteur de clonage	Qiagen
pBBR1-MCS5	Vecteur d'expression	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pVLT31	Vecteur d'expression	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993)
pGEM-T easy	Vecteur de clonage	Promega
pCR-Script Amp	Vecteur de clonage	Stratagene
pCR Blunt TOPO	Vecteur de clonage	Invitrogen
pDRCD	pDrive contenant <i>phdCD</i>	Cette étude
pBBRCD	pBBR1-MCS5 contenant <i>phdCD</i>	Cette étude
pSKU03	pCR-Script contenant <i>pdoA1</i>	Cette étude
pSKU04	pCR-Script contenant <i>pdoB1</i>	Cette étude
pSKU05	pET9a contenant <i>pdoB1</i>	Cette étude
pSKU06	pET9a contenant <i>pdoA1B1</i>	Cette étude
pSKU07	Clone d'ADN génomique contenant <i>pdo2</i>	Cette étude
pSKU08	pCR Blunt TOPO contenant <i>pdoA2B2</i>	Cette étude
pSKU09	pT9a contenant <i>pdoA2B2</i>	Cette étude
pEHPDO1	pET15b contenant <i>pdoA1B1</i>	Cette étude
pEHPDO2	pET15b contenant <i>pdoA2B2</i>	Cette étude
pPDO1	pVLT31 contenant <i>pdoA1B1</i>	Cette étude
pPDO2	pVLT31 contenant <i>pdoA2B2</i>	Cette étude
pVDO1	pVLT31 contenant <i>pdoA1B1</i> avec un His-tag	Cette étude
pVDO2	pVLT31 contenant <i>pdoA2B2</i> avec un His-tag	Cette étude
p26C5	Clone d'ADN génomique contenant <i>pdo3</i>	Cette étude
pSKU10	pDrive contenant <i>pdoA3</i>	Cette étude
pSKU11	pDrive contenant <i>pdoB3</i>	Cette étude
pEB431	pET contenant <i>phnA4A3</i>	(Demanèche <i>et al.</i> , 2004)

#### 4. Cultures en fermenteur

Les cultures de grand volume ont été réalisées dans un fermenteur SGI-Inceltech, modèle Discovery 100, dont la capacité utile maximale est de 12 L. L'agitation était assurée par une turbine à 400 tr/mn et l'aération maintenue à 200 L/h.

## 5. Milieux

Milieu MSM (pour 1 L):

NH <sub>4</sub> Cl	1,2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4g
NaCl	0,1g
H <sub>2</sub> O	qsp 1 L

Le pH de la solution est ajusté à 7,1 avec de l'HCl. La solution est autoclavée et après stérilisation on ajoute 10 mL de chacune des solutions stériles suivantes :

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	20 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	10 g/L
Fe-EDTA*	1 g/L
Extrait de levure	2 g/L

\* stérilisé par filtration

### C. Conjugaison bactérienne entre *E. coli* et *Pseudomonas*

L'introduction de plasmides dans *Pseudomonas putida* KT2442 a été réalisée par conjugaison triparentale. Cette technique consiste à transférer un plasmide entre deux bactéries par contact physique. Dans cette étude, le plasmide pVLT31 est mobilisé par une bactérie « helper ». Celle-ci contient le plasmide pRK600 qui porte les fonctions de mobilisation via les gènes *tra*. La conjugaison se fait en mettant en présence les souches donneuse, helper et receveuse récoltées en phase exponentielle de croissance, rincées et remises en suspension dans un faible volume de MgSO<sub>4</sub> à 10 mM. Les cellules sont étalées sur ~4 cm<sup>2</sup> de LB dans une boîte de Pétri pendant 24 heures. Les transconjugants sont ensuite sélectionnés par stries sur une boîte de LB contenant de la rifampicine et de l'antibiotique adéquat.

## 2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

### A. Préparation d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1

L'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été extrait à partir de cultures en milieu MSM supplémenté par du benzoate ayant atteint une  $DO_{600} \sim 0,7$  en adaptant une méthode spécialement conçue pour l'extraction d'ADN de mycobactéries (Gonzalez-y-Merchand *et al.*, 1996). Les cellules ont été centrifugées puis reprises dans un petit volume de tampon TE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM). Leur paroi a été fragilisée par un traitement de 30 min au lysozyme à 10 mg / mL à 37°C. La suspension a été ajustée à 1% de SDS puis les cellules ont été assujetties à 3 cycles de congélation dans l'azote liquide pendant 30 sec suivie d'une décongélation 10 min à 65°C. Un traitement au bromure de cetyl trimethyl ammonium (CTAB) (11,3 g/L) a été effectué pour faciliter l'élimination des protéines et des polysaccharides par deux extractions au chloroforme-alcool isoamylique suivies de deux extractions au phénol-chloroforme (centrifugation 20 min à 10 000 x g). Les acides nucléiques ont été précipités par 0,6 volume d'isopropanol. Après centrifugation, l'ADN a été lavé à l'éthanol 70% puis repris en tampon TE. L'ADN a été dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

### B. Construction d'une banque d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1

Une banque d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été construite à l'aide d'un dérivé du phage  $\lambda$  (kit  $\lambda$ -ZAP Express, Stratagene). Les banques d'ADN génomique en phage  $\lambda$  permettent l'intégration de fragments d'ADN jusqu'à une taille d'environ 10kb.

Après avoir déterminé les conditions de digestion enzymatique optimales, 100 $\mu$ g d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 ont été digérés par *Bam*HI puis les fragments générés ont été introduits par ligation dans le vecteur.

L'ADN a été encapsidé à l'aide d'une préparation de particules (Gigapack Extracts, Stratagene) : 4  $\mu$ L de mélange ont été ajoutés dans un tube de particules d'encapsulation, le tout a été incubé pendant 90 min à température ambiante. La réaction d'encapsulation a été stoppée par addition de 200  $\mu$ L de tampon SM (Tris-HCl 50 mM

pH 7,5 ; NaCl 0,1 M ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 8 mM ; gelatine 0,01 % (p/v)). Après titration de la solution mère de phages obtenue, la banque a été amplifiée en faisant produire de nouveaux phages à des cellules de *E. coli* transfectées, ceci afin d'en conserver dans 7% de DMSO à -80°C.

La banque sous forme de phages a été introduite dans *E. coli* sous forme de phagemides. Pour cela, des cellules de *E. coli* XL1-Blue MRF' ayant été cultivées sur du milieu LB en présence de MgSO<sub>4</sub> (10 mM) et de maltose (0,2 % p/v), les phages de la banque et le phage helper ExAssist ont été mis en solution selon le ratio 1 :10 :10. Après une incubation de 15 min à 37°C afin de permettre l'adsorption des phages sur les cellules, celles-ci ont été incubées à 37°C avec 20 mL de LB pendant 2h30. Après un traitement de 20 min à 65°C puis une centrifugation à 1000 x g pendant 10 min, le surnageant contenant les phagemides a été titré avec les cellules hôtes, *E. coli* SOLR. Pour cela 200 µL de suspension bactérienne ont été incubés avec 1 µL de dilution 10<sup>-2</sup> et 10<sup>-4</sup> de la suspension de phagemides pendant 15 min à 30°C. Le mélange a ensuite été étalé sur des boîtes de LB + Km20.

Environ 3000 cfu ont été étalées sur boîtes LB afin d'individualiser les clones de la banque dans des boîtes 96 puits contenant 100 µL de LB + Km20. 26 boîtes ont été réalisées, soit un total de 2496 clones, ce qui devrait permettre de couvrir 91,8% du génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1 d'après la formule :

$$\ln (1-P) = N \times \ln (1 - I / G)$$

où P est la probabilité de couvrir le génome, N est le nombre de clones, I est la taille moyenne de l'insert, G est la taille estimée du génome. Pour le calcul, les valeurs retenues sont de N=2496 clones, I= 5.10<sup>3</sup> pb et G=5.10<sup>6</sup> pb.

## **C. Amplification *in vitro* de fragments d'ADN (PCR)**

### **1. Mode opératoire**

Les fragments d'ADN destinés à être utilisés comme sondes ou pour de simples vérifications ont été générés à l'aide de l'ADN *Taq* polymérase (Promega). Cette enzyme génère des fragments portant une adénosine non appariée en extrémité 3',

facilitant le clonage dans des vecteurs possédant une thymidine non appariée aux extrémités 3' (ex : pGEM-T, Promega). Le mélange réactionnel d'un volume de 50 µL a été ajusté aux concentrations finales suivantes : 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X tampon PCR, 100 µM dNTP, 4 µM d'oligonucléotides, 100 ng de matrice ADN, 2U de *Taq* DNA polymérase.

Le programme de PCR usuel, réalisé à l'aide d'un thermocycler (T personal, Biometra), était le suivant :

- dénaturation totale de 5 min à 95°C
- 30 cycles de dénaturation (45 s à 95°C) / hybridation (45 s à la température d'hybridation du couple d'oligonucléotides choisi pour l'amplification) / élongation (1 min par kb à 72°C).
- élongation terminale de 5 min à 72°C

Les gènes destinés à être surexprimés ont été amplifiés à l'aide d'une ADN polymérase générant moins d'erreurs que la *Taq* polymérase. Les kits commerciaux employés contiennent de la *Taq* polymérase modifiée (Stratgene) ou un mélange des polymérases *Taq* et *Pfu* (Promega). La *Taq* DNA polymérase permet une vitesse de réaction élevée, alors que la *Pfu* DNA polymérase, par son activité « proof-reading » permet de corriger les erreurs de duplication. Les conditions d'amplification restent les mêmes.

## **2. Criblage de clones recombinants par PCR sur colonies**

Afin de cribler rapidement les transformants (ou la banque d'ADN génomique), des amplifications par PCR ont été réalisées directement sur des colonies. Quelques cellules ont été prélevées d'une colonie isolée sur boîte de culture à l'aide d'un cure-dent, puis plongées dans 10 µL de mélange réactionnel contenant du tampon PCR 1X, du MgCl<sub>2</sub> à 2,5 mM, des dNTP à 100µM, 4 µM d'oligonucléotides et 0,3 U de *Taq* DNA polymérase. Les fragments PCR générés ont été analysés par migration sur gel d'agarose à concentration *ad hoc*.



### 3. Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés au cours de ce travail sont présentés dans le tableau 2-3. Ils ont été synthétisés par Sigma-Genosys, Genome-express ou Eurogentec.

**Tableau 2-3** Oligonucléotides utilisés lors de cette étude pour les réactions de PCR. Signification des lettres employées autres que A, C, G et T : R=A ou G, Y=C ou T, M=A ou C, S=G ou C, W=A ou T, D=G, A ou T, B=G, T ou C, H=A, T ou C.

Nom	Séquence (5'→3')	Caractéristiques
pdoA1-F-NdeI	GGCATATGCAAACGGAAACGACCGA	Introduit le site <i>NdeI</i> en 5' de <i>pdoA1</i>
pdoA1-R-EcoRV	GGGATATCTCAAGCACGCCCCGCCGAATG	Introduit le site <i>EcoRV</i> en 3' de <i>pdoA1</i>
pdoB1-F-NdeI	GGCATATGAACGCCGTTGCCGTGGA	Introduit le site <i>NdeI</i> en 5' de <i>pdoB1</i>
pdoB1-R-BamHI	GGGGATCCTACAGGACTACCGACAG	Introduit le site <i>BamHI</i> en 3' de <i>pdoB1</i>
pdoA1-F	ATGCAAACGGAAACGACCGA	S'hybride en 5' de <i>pdoA1</i>
pdoA1-R	CTCAAGCACGCCCCGCCGAATG	S'hybride en 3' de <i>pdoA1</i>
P10F	ATGGTNGCNACNGTNGARCA	Oligonucléotide dégénéré, partie 5' de <i>pdoB2</i>
P10R	TCYTCNGCCANGCRATYTC	Oligonucléotide dégénéré, partie interne de <i>pdoB2</i>
pdoA2-F-NdeI	GGCATATGTCTACTGTGCGTAAGAA	Introduit le site <i>NdeI</i> en 5' de <i>pdoA2</i>
pdoB2-R-BglII	GGAGATCTTAGAAGAAGTTAGCCAG	Introduit le site <i>BglII</i> en 3' de <i>pdoB2</i>
K15	ATGAAYGCNGTNGCNGTNGAYMGNGAY	Oligonucléotide dégénéré, partie 5' de <i>pdoB1</i> et <i>pdoB3</i>
nidB-R	GGGGATCCTACAGGACTACCGACAG	partie 3' de <i>pdoB1</i> ou <i>pdoB3</i>
pdoA3-F	GCATATGACCACCGAAACAAACC	Introduit un site <i>NdeI</i> en 5' de <i>pdoA3</i>
pdoA3-R	GGAATTCTCAAGCACGCCCCGCC	Introduit un site <i>EcoRI</i> en 3' de <i>pdoA3</i>
pdoB3-F	GGAATTCGAGGAGTTCGGTGTGATG	Introduit un site <i>EcoRI</i> en 5' de <i>pdoB3</i>
pdoB3-R	CGGATCCTACAGGAATACCGACAGG	Introduit un site <i>BamHI</i> en 3' de <i>pdoB3</i>
REDCONS1	TTGGAYAGWGGCGGWCGBTCRTAWGG	Oligonucléotide dégénéré, séquence de réductase
REDCONS1-R	CCSTAYGARGSCCGCCSCTRITCAA	Oligonucléotide dégénéré, séquence de réductase
REDCONS2	YTGRTCRWSCCAGSACCA	Oligonucléotide dégénéré, séquence de réductase
REDCONS3-F	RTNRTNGGNGSNGGNYDNRTNGG	Oligonucléotide dégénéré, séquence de réductase
REDCONS3-R	CCNAYNHRNCCNWCNCCNAYNAY	Oligonucléotide dégénéré, séquence de réductase
REDCONS4-R	RTCNCCNRYNGCRSANAY	Oligonucléotide dégénéré, séquence de réductase

#### D. Préparation d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique bactérien a été préparé par lyse alcaline (Ish-Horowicz et Burke, 1981): un volume de 1,5 mL de culture à saturation a été sédimenté par centrifugation 10 min à 10 000 x g. Le culot a été repris dans 100 µL de tampon TGE

(Tris-HCl 25 mM pH8 , EDTA 10 mM, glucose 50 mM) et incubé 5 min à température ambiante. Les cellules ont été lysées en ajoutant 200  $\mu$ L d'une solution de NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v). Le mélange, après homogénéisation par inversion du tube, a été laissé 5 min à 0°C. On a ensuite ajouté 150  $\mu$ L d'acétate de potassium 5 M pH 4,8 en poursuivant l'agitation doucement pendant 5 min à 0°C. Le précipité a été éliminé par centrifugation 15 min à 10 000 x g à 4°C. L'ADN du surnageant a été précipité par 2,5 volumes d'éthanol pendant 1h à -20°C. Après 10 min de centrifugation, le culot a été lavé avec de l'éthanol 70 %, séché puis repris dans un volume de 10 à 50  $\mu$ L de tampon TE. L'ADN plasmidique ainsi préparé était généralement de pureté convenable pour l'analyse de restriction.

Pour obtenir des préparations d'ADN de qualité supérieure à des fins de séquençage ou de clonage, les kits commerciaux mini-, midi- ou maxi-prep (Qiagen ou Macherey-Nagel) ont été utilisés selon les recommandations du fabricant.

#### **E. Digestion enzymatique de l'ADN et purification de fragments**

L'ADN génomique ou plasmidique a été digéré par des enzymes de restriction (Eurogentec, Roche, Fermentas ou Promega) dans le tampon adéquat pendant une à deux heures selon la quantité d'ADN à digérer et le but de la digestion.

Les fragments d'ADN obtenus par PCR ou par digestion enzymatique ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de marqueurs de taille (1 kb ou 100 bp DNA ladder, Proméga ou Fermentas). Dans un champ électrique, les fragments d'ADN se déplacent vers l'anode à une vitesse inversement proportionnelle à leur masse moléculaire donc leur taille. Ces électrophorèses ont été réalisées dans des appareils d'électrophorèse Mupid (Eurogentec) pour gels horizontaux en tampon TBE 0,5X (Tris-HCl 45 mM pH 8,3, acide borique 0,45 mM, EDTA 1mM) à voltage constant de 50 ou 100 V. Après coloration dans un bain de bromure d'éthidium, les fragments ont été révélés sous lumière UV. Les fragments d'ADN destinés à être clonés ou nécessitant une purification ont été extraits de l'agarose par l'utilisation des kits commerciaux Qiaex II ou Qiaquick (Qiagen) selon la taille du fragment à purifier.

## **F. Ligation vecteur-insert**

Les ligations entre vecteurs et inserts ont été réalisées soit à température ambiante à l'aide du kit Rapid DNA ligation selon les recommandations du fournisseur (Fermentas), soit la nuit à 4°C (extrémités cohésives) ou 16°C (extrémités franches) avec la T4 DNA ligase (Promega). Dans ce dernier cas, 20 ng de plasmide minimum ont été rajoutés à différentes quantités d'insert (ratio variant de 1:5 à 1:100) dans du tampon de ligation 1X en présence de 3U de T4 DNA ligase.

## **G. Marquage de sondes nucléiques à la digoxygénine (DIG)**

Cette technique consiste à incorporer un nucléotide (dUTP) marqué à la DIG (stéroïde) au hasard (random-priming) dans un fragment d'ADN. Les marquages ont été réalisés sur 1 µg de produit PCR purifié sur gel d'agarose selon les recommandations du fournisseur (Roche). Un mélange d'héxanucléotides s'hybridant de façon aléatoire sur l'ADN monobrin que l'on veut marquer a été utilisé comme amorce pour synthétiser le brin complémentaire marqué au DIG-dUTP grâce à l'ADN polymérase.

Afin de détecter les fragments marqués à la digoxygénine, des anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline ont été utilisés. La phosphatase alcaline réalise la déphosphorylation d'un de ses substrats, le CSPD, au cours d'une réaction chimio-luminescente. La position de la sonde peut alors être révélée par exposition à un film photosensible (Hyperfilm ECL, Amersham).

## **H. Détection d'ADN par hybridation de type Southern**

L'ADN génomique a été digéré par différentes enzymes de restriction puis les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. L'ADN a ensuite été transféré sur une membrane de nylon Biodyne plus (Pall LifeSciences). Le transfert a été réalisé sous vide d'après la méthode décrite par Olszewska et Jones (Olszewska et Jones, 1988). L'ADN a été fixé sur la membrane par exposition au rayonnement UV pendant 5 min.

La membrane a été pré-incubée pendant 1h à 65°C en présence de tampon d'hybridation. Après avoir été dénaturée 10 min à 100°C, la sonde a été rajoutée et

l'hybridation s'est déroulée sur la nuit à 65°C. Le complexe ADN-sonde sur la membrane a été révélé par immunodétection tel que préconisé par le fabricant du kit DIG (Roche).

## **I. Transformation bactérienne et sélection de clones recombinants**

### **1. Préparation des cellules compétentes par traitement au $\text{CaCl}_2$**

Les bactéries devant être transformées ont été mises en pré-culture dans 3,5 mL de LB pendant une nuit à 37°C. Le lendemain, 20 mL de LB ont étéensemencés par la pré-culture puis incubés à 37°C. A  $\text{DO}_{600} \sim 0,6$  la culture a été centrifugée pendant 5 min à 5000 x g. Le culot de bactéries a été repris dans 4 mL de tampon RF1 (acétate de potassium 30 mM, KCl 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM,  $\text{MnCl}_2$  50 mM, glycérol 15% (v/v), pH 5,8) et incubé 20 min à 0°C. La suspension bactérienne a ensuite été centrifugée 5 min à 5000 x g. Le culot a alors été repris dans 400  $\mu\text{L}$  de tampon RF2 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  75 mM glycérol 15% (v/v) pH ajusté à 6,8 avec du KOH). La suspension bactérienne a alors été congelée en présence de glycérol 20 % (p/v), permettant la conservation des cellules à -80°C pendant plusieurs mois sans perdre leur compétence.

### **2. Transformation par choc thermique**

50  $\mu\text{L}$  de bactéries compétentes ont été mis en présence de quelques nanogrammes de plasmide et incubées dans la glace pendant 20 à 30 min. Les bactéries subissent alors un choc thermique pendant 45 sec à 37°C après lequel elles sont remises 2 min dans la glace. La suspension a ensuite été incubée pendant 1h à 37°C en présence de LB afin d'induire la résistance à l'antibiotique permettant la sélection des transformants.

### **3. Criblage des transformants**

Le criblage des bactéries ayant incorporé le plasmide a été réalisé sur milieu de LB gélosé contenant le ou les antibiotique(s) adéquats. Si le vecteur utilisé le permettait, un

criblage bleu/blanc pouvait être réalisé, dans ce cas on rajoutait du X-Gal 4% (p/v) et de l'IPTG à 0,5 mM. Dans ces conditions, seules les bactéries ayant incorporé un plasmide recombinant (colonies blanches) ou non-recombinant (colonies bleues) peuvent croître. La suspension bactérienne, après transformation, a été étalée sur boîtes de Pétri, lesquelles ont été incubées pendant une nuit à 37°C. Les colonies blanches ont été récupérées puis analysées.

#### **4. Analyse des clones recombinants**

Les colonies blanches ont été analysées par PCR comme cela a été décrit (paragraphe 2.C.2). L'ADN plasmidique des clones sélectionnés par PCR a été préparé comme décrit (paragraphe 2.D) puis digéré par des enzymes de restriction afin de vérifier la taille de l'insert ainsi que son orientation dans le vecteur.

### **J. Surexpression de protéines chez *E. coli***

#### **1. Principaux systèmes de surexpression utilisés**

Les vecteurs d'expression bactériens de type pET ou pBBR1-MCS utilisés dans cette étude sont décrits dans le tableau 2-2. Les gènes à surexprimer ont été clonés dans les plasmides pET9a ou pET15b. Dans les vecteurs pET, le ou les gène(s) d'intérêt sont clonés sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. L'expression est réalisée dans une souche bactérienne possédant une copie chromosomique du gène codant pour l'ARN polymérase T7, placée sous le contrôle du promoteur lacUV5, inducible par l'IPTG. Ainsi l'addition d'IPTG dans le milieu de culture déclenche l'expression de l'ARN polymérase T7, qui à son tour catalyse la transcription des gènes clonés dans les vecteurs pET de manière exclusive et à très haut niveau. Les plasmides pET9a et pET15b diffèrent notamment par la présence d'une séquence codant pour une étiquette poly-histidine du côté 5' dans pET15b ; ainsi que par la résistance à l'antibiotique.

Les plasmides pBBR1-MCS sont des vecteurs à large spectre d'hôtes, permettant ainsi de réaliser l'expression de protéines chez *E. coli* comme chez *Pseudomonas*. Les gènes clonés sont placés sous le contrôle du promoteur *lac* inducible par l'IPTG.

Le plasmide pVLT31 a aussi été employé car il possède un promoteur fort *Ptac*, inducible par de l'IPTG et permet l'expression de protéines recombinantes à un taux élevé dans des bactéries Gram<sup>-</sup> telles que *Pseudomonas* (de Lorenzo *et al.*, 1993).

Trois souches de *E. coli* ont été employées : les souches BL21 (DE3) et BL21 (DE3)(pLysS) ainsi que la souche BL21 AI. Ces souches ont été optimisées pour réaliser l'expression de protéines. Elles diffèrent par le mode d'induction : l'ARN polymérase de T7 y est placée sous le contrôle de lacUV5 dans BL21 (DE3) ou BL21 (DE3) (pLysS), alors que pour BL21 AI elle est placée sous le contrôle du promoteur *AraBAD* inducible par l'arabinose. La souche BL21 (DE3) (pLysS) contient le plasmide pLysS qui code pour le lysozyme du phage T7 qui inactive l'ARN polymérase T7 et permet de contrôler l'expression de manière plus stringente.

## **2. Conditions d'expression**

L'expression des protéines recombinantes a été induite par addition d'inducteur (IPTG ou arabinose) à différentes concentrations selon le but de l'expérience (mesure de l'activité *in vivo*, purification). L'influence de la température sur le niveau d'expression ainsi que sur la solubilité des protéines recombinantes a été testée (15°C, 25°C, 30°C et 37°C). Pour l'expression avec le système pET, la durée d'induction était en général de 3h alors que pour le plasmide pVLT31 une durée de 20h était nécessaire pour obtenir une production optimale de protéine recombinante.



### **3. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE**

#### **A. Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide**

Les électrophorèses sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ont été réalisées d'après la méthode décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Les protéines y sont séparées selon leur masse moléculaire, en conditions dénaturantes.

##### **1. Préparation des échantillons protéiques**

Les protéines doivent être dénaturées avant d'être déposées dans les puits des gels de polyacrylamide. Elles sont reprises dans un tampon de façon à obtenir une solution dont la composition finale est Tris 0,1 M pH 8,8, glycérol 10 % (v/v), SDS 1 % (p/v),  $\beta$ -mercapto-éthanol 2,5 %, bleu de bromophénol 0,001 % (p/v). La solution protéique est ensuite incubée 2 à 3 min à 100°C afin de dénaturer les protéines.

##### **2. Préparation des gels de polyacrylamide et conditions de migration**

Deux gels se succèdent : un gel de concentration suivi d'un gel de séparation. Une solution d'acrylamide : bisacrylamide (30 :8) a été diluée à 4,5 % en tampon Tris pH 8,8 pour le gel de concentration et à 12,5 % pour le gel de séparation. L'électrophorèse a été réalisée dans un appareil SE200 pour gels verticaux de 6 cm x 8 cm x 1,5 mm (Hoeffer Scientific Instrument) à température ambiante, dans un tampon Tris 25 mM, glycine 0,192 M pH 8,3, SDS 0,1 % sous un ampérage de 15 mA pendant la concentration puis de 45 mA pendant la séparation. A la fin de la migration le gel est coloré au bleu de Coomassie.



## **B. Electrotransfert de polypeptides sur membrane**

Après avoir été séparés par SDS-PAGE, les polypeptides ont été transférés sur membrane de nitrocellulose sous l'effet d'un champ électrique. La membrane et le gel ont été équilibrés dans du tampon de transfert (tampon de migration contenant 20 % d'éthanol) pendant 10 min. Le transfert a été réalisé dans un appareil Fast-Blot B33 (Biometra) pendant 30 min sous un ampérage de 4 mA/cm<sup>2</sup> de membrane. La membrane et le gel ont été insérés entre deux couches de papier Whatmann de type 3MM, préalablement imbibés de tampon de transfert. Après le transfert, la membrane a été rincée à l'eau puis le transfert a été vérifié en colorant les polypeptides de la membrane de façon réversible à l'aide d'une solution de rouge Ponceau-S 1 % (p/v) dans l'acide acétique 5 % (v/v). Les polypeptides recherchés ont ensuite été révélés par immunodétection.

## **C. Révélation immunochimique**

Après transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose a été saturée par incubation 30 min dans du PBS-Tween pH7,4 (NaCl 0,14M ; KCl 2,7 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM et Tween 20 0,5 % (v/v)) contenant de la sérum albumine bovine (BSA) à 3 % (p/v). Elle a ensuite été incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de PBS-Tween + BSA pendant 30 min à température ambiante. Après trois rinçages successifs de 10 min chacun par du PBS-Tween, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort dans les mêmes conditions que pour l'anticorps primaire. Trois autres lavages de 10 min ont permis d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire avant de procéder à la révélation par un mélange 1 :1 des solutions A et B du kit de détection ECL. La membrane a alors été exposée à un film photographique (Hyperfilm, ECL) pendant 30 sec. Ce dernier a été révélé par les techniques classiques de photographie (révélation et fixation).

#### **D. Dosage des protéines**

La concentration des protéines a été déterminée par la méthode BCA (Pierce). Une gamme étalon a été réalisée en utilisant la BSA à des concentrations de 0,1 à 1 mg/mL. Des aliquots des échantillons à analyser dilués dans un volume de 10 ou de 100 µL ont été mélangés à 1 mL de réactif (mélange des solutions A et B selon un rapport 1:50). Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance à 562 nm a été mesurée contre un blanc de réactif.

#### **E. Dosage de l'activité catalytique des dioxygénases *in vivo***

Les dosages d'activité catalytique des dioxygénases Pdo1 et Pdo2 ont été réalisés par incubation des hydrocarbures aromatiques avec les cellules bactériennes au repos, exprimant Pdo1 ou Pdo2 (resting cell assay) après adaptation du protocole décrit par Rodarie et Jouanneau (Rodarie et Jouanneau, 2001). Les souches de *E. coli* BL21 AI portant les plasmides avec les gènes des dioxygénases ont été cultivées à 37°C en LB contenant les antibiotiques adéquats jusqu'à une  $DO_{600} \sim 1$ . A ce moment, la synthèse des transporteurs d'électrons a été induite par 0,5 mM d'IPTG pendant 4h à 30°C. La synthèse des dioxygénases a ensuite été induite par 0,2 % d'arabinose pendant 20h à 25°C. Les cellules ont alors été centrifugées pendant 10 min à 5000 x g avant d'être reprises en milieu M9 contenant du glucose à 0,2 % et des antibiotiques adéquats. Le substrat, l'hydrocarbure aromatique, a été ajouté en solution dans l'huile de silicone dans une proportion huile : eau de 1 : 5. Les cultures ont été incubées pendant 6h à 30°C sous agitation.

Les métabolites de la phase aqueuse ont été extraits par passage sur une colonne d'interaction hydrophobe de 0,5 mL de type C18-U (Interchim). Les colonnes ont été équilibrées par de l'eau ultrapure, avant de déposer les échantillons. Elles ont ensuite été lavées par 10 mL d'eau ultrapure puis les métabolites en ont été élués par 1 mL de méthanol et séchés au speed-vac dans des tubes Eppendorf. Le contenu en produits dihydroxylés a alors été estimé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG/SM) comme décrit au paragraphe 4.B.

## F. Préparation d'extraits de protéines de *Mycobacterium* sp. 6PY1

Après culture, les bactéries ont été sédimentées par centrifugation 15 min à 15 000 x g. Le culot bactérien a été repris dans 2 volumes de tampon de lyse (Tris-HCl 75 mM pH8,0, EDTA 10 mM, glycérol 10%). La suspension après avoir été soumise à un traitement aux ultrasons pendant 10 min (10% d'amplitude) a été centrifugée à 10 000 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été supplémenté avec de la spermine à 10 mM, puis centrifugé 20 min à 290 000 x g (Beckman, L100). Après dialyse contre du tampon phosphate à 2 mM (pH 7,5) dans une cassette à dialyse à 10 kDa de seuil de coupure, les échantillons ont été congelés à -20°C.

## G. Dosage de l'activité NADH oxydoreductase

Afin de réaliser des dosages d'activité *in vitro*, un complexe multienzymatique composé d'une réductase, d'une ferrédoxine et d'une dioxygénase a été reconstitué. En l'absence des transporteurs d'électrons associés aux dioxygénases de *Mycobacterium* sp. 6PY1, ceux d'autres bactéries ont été utilisés. Il s'agit de la réductase BphG de *Comamonas testosteroni* sp. B-356, impliquée dans l'oxydation du biphenyle (RED<sub>356</sub>), et de la ferredoxine BphA3 de *Pseudomonas* sp. B4 (FER<sub>B4</sub>), également impliquée dans l'oxydation du biphenyle. Ces deux transporteurs d'électrons ont été choisis car les souches permettant de les surproduire pour les purifier étaient disponibles au laboratoire. L'activité NADH oxydase du complexe hybride a été dosée par mesure de l'oxydation du NADH à 340 nm ( $\epsilon_{340}=6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Le mélange réactionnel, d'un volume de 100  $\mu\text{L}$ , était composé de 50 nmoles de NADH, 0,6 nmoles de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ , 0,5 nmoles de RED<sub>356</sub>, 1 nmole de FER<sub>B4</sub>, 0,5 nmole de Pdo2 et 50 nmoles de phénanthrène (dans l'acétone), le tout dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,5. La réaction a été initiée par l'ajout du substrat (phénanthrène) ; elle a été incubée pendant 15 min à 30°C dans un tube Eppendorf. La réaction a été stoppée par l'ajout de 400  $\mu\text{L}$  de tampon HEPES 100 mM pH8,0 froid. L'absorbance était mesurée après 30 sec de centrifugation. Le témoin utilisé consistait en l'ensemble du mélange dépourvu de NADH.

## **4. TECHNIQUES BIOPHYSIQUES ET SPECTROSCOPIQUES**

### **A. Spectroscopie d'absorption UV-visible**

#### **1. Principe**

Une molécule en solution peut absorber l'énergie de photons incidents et passe d'une forme stable  $S_0$  à une forme excitée  $S_1$ . L'absorption moléculaire dans le spectre UV-VIS dépend de la structure électronique de la molécule. Chaque molécule est ainsi caractérisée par l'intensité de son absorption donnée par la relation de Beer-Lambert :  $A(\lambda) = \epsilon(\lambda).l.c$  où  $A$  représente l'absorption ;  $\epsilon$ , le coefficient d'absorption molaire spécifique de la molécule ;  $l$ , la longueur du trajet optique et  $c$ , la concentration de la molécule dans la solution.

Les molécules biologiques qui absorbent sont celles qui possèdent des doubles liaisons conjuguées, des noyaux aromatiques et celles qui contiennent un métal de transition. Dans le cas des protéines à centres [Fe-S], le transfert de charge du soufre vers le fer provoque une absorption entre des longueurs d'ondes de 300 à 600 nm. De plus, l'ensemble de ses bandes d'absorption est plus ou moins caractéristique d'un type de centre [Fe-S] et permet de suivre son état d'oxydation.

#### **2. Conditions d'obtention des spectres UV-visible**

L'échantillon à analyser a été placé dans une cuvette en plastique (visible) ou en quartz (UV-visible) selon la gamme dans laquelle le spectre devait être réalisé. Le trajet optique de cette cuve était soit de 0,2 cm, soit de 1 cm. Le spectre d'absorption a été enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre à barrette de diode (Hewlett Packard 8452A).

## **B. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)**

### **1. Principe**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) implique la volatilisation de l'échantillon à haute température dans un injecteur, la séparation des analytes en phase gazeuse dans une colonne spéciale, et la détection et l'identification de chaque composé par le spectromètre de masse. La circulation de l'échantillon à l'intérieur de la colonne de chromatographie est assurée par un flux d'hélium. La séparation des composés est déterminée par leur distribution, au cours du temps, entre la phase mobile (gaz vecteur) et la phase stationnaire (matrice de la colonne). Cette distribution varie selon la structure et l'hydrophobicité des analytes.

### **2. Conditions expérimentales**

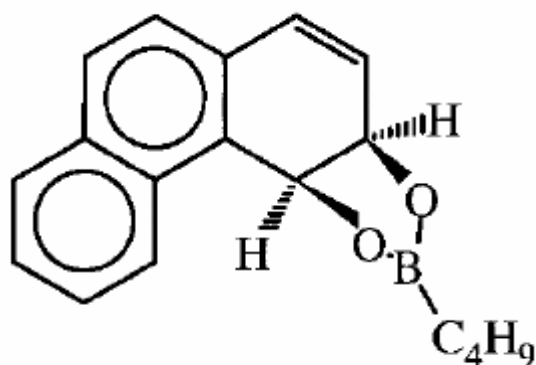
On a utilisé un chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard HP6890 couplé à un spectromètre de masse HP5973 avec analyseur quadripolaire. Les échantillons ont été injectés sur une colonne MDN-12. Les différents dérivés hydroxylés ont été détectés en mode SIM, permettant de ne rechercher que certains ions, afin d'éliminer le bruit de fond. Le programme de température a été le suivant :

Température initiale :	75°C pendant 3 min
Rampe 1 :	de 75°C à 250°C à 12°C/min
Rampe 2 :	de 250°C à 300°C à 10°C/min
Température finale :	300°C pendant 10 min
Durée totale du programme :	32 min 34 sec

### **3. Dérivation des dérivés hydroxylés des HAP**

Les dihydrodiols formés par les dioxygénases, à partir des HAP, n'étaient pas détectable directement par analyse en CPG/SM. Pour ce faire, il a fallu réaliser au préalable une dérivation chimique, permettant de diminuer le caractère polaire des dihydrodiols et augmentant leur évaporation. Pour cela, les métabolites récupérés sur

colonne C18-U ont été évaporés dans des tubes Eppendorf au speed-vac avant d'être repris dans 135  $\mu\text{L}$  de DMF. On a ajouté 15  $\mu\text{L}$  de *n*-butylboronate (NBB) et agité vigoureusement. Ce réactif ne réagit qu'avec les diols, donnant des dérivés comme celui présenté figure 2-1. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 1h avant d'être centrifugé (5 min, 10 000  $\times g$ ) et d'être transféré dans des tubes d'analyse CPG/SM.



**Figure 2-1** - Structure du 3,4-dihydroxyphénanthrène ayant réagi avec le NBB



# RESULTATS





## CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. IDENTIFICATION DE TROIS DIOXYGENASES

L'analyse des métabolites intermédiaires de dégradation du pyrène par *Mycobacterium* sp. 6PY1 a mis en évidence la formation de 4,5-pyrène dihydrodiol, indiquant que la première étape de dégradation du pyrène est catalysée par une dioxygénase. Le clonage des gènes impliqués dans la dégradation du pyrène par *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été entrepris afin de connaître leur séquence nucléotidique et en déduire l'organisation dans le génome.

La stratégie employée pour identifier les gènes de dégradation du pyrène chez *Mycobacterium* sp. 6PY1 s'appuie sur l'induction de leur expression spécifiquement en présence de pyrène. Des électrophorèses bidimensionnelles suivies de séquençage N-terminal ou interne des polypeptides spécifiques ont permis d'identifier des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de deux dioxygénases différentes, par les similitudes qu'elles présentent avec d'autres sous-unités de dioxygénases (Krivobok *et al.*, 2003).

Ce chapitre présente la stratégie employée pour détecter et cloner les gènes de *Mycobacterium* sp. 6PY1. Ce travail a conduit à l'identification de trois loci contenant des gènes de structure de dioxygénases. Les séquences de ces gènes ont été analysées et comparées avec des séquences d'autres dioxygénases, permettant de faire une étude phylogénétique sur ces séquences.

#### A. Détection d'un gène de structure de dioxygénase dans le génome de la souche 6PY1

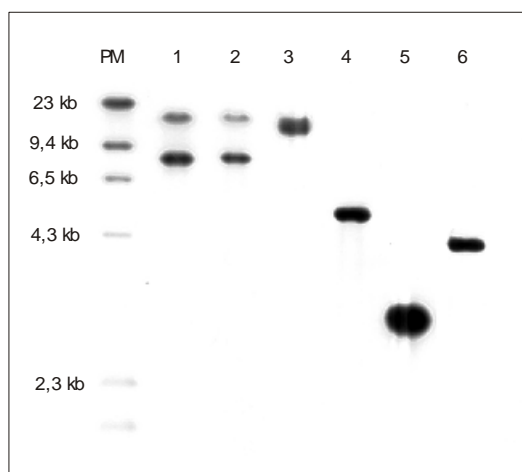
Le séquençage des polypeptides spécifiquement induits en présence de pyrène a permis d'obtenir des éléments de séquence caractéristiques de deux arène dioxygénases. Dans le but d'isoler les gènes correspondants, des oligonucléotides dégénérés ont été réalisés à partir des séquences N-terminales. Un oligonucléotide a également été réalisé

à partir d'un alignement de séquence de sous-unités  $\alpha$ , dans la zone conservée codant pour les acides aminés ligands du centre [2Fe-2S], dont la séquence est CSYHGW (figure 3-1). A l'aide de ces oligonucléotides, un fragment de 372 pb a été amplifié par PCR puis cloné. La séquence nucléotidique de ce fragment, appelé pdoA, a permis de déduire une séquence de 124 acides aminés présentant une forte ressemblance avec la partie N-terminale de dioxygénases déjà publiées. Le polypeptide identifié correspondait donc effectivement à une sous-unité  $\alpha$  de dioxygénase, le gène sera nommé *pdoA1*.

BphA	K	S	I	K	V	F	L	N	Q	C	R	H	R	G	M	R	I	C	R	S	D	A	G	N	A	K	A	F	T	C	S	Y	H	G	W	A	Y	D	I	A
TodC1	A	S	I	A	V	F	L	N	Q	C	R	H	R	G	M	R	I	C	R	A	D	A	G	N	A	K	A	F	T	C	S	Y	H	G	W	A	Y	D	T	A
NidA	G	R	I	Q	A	L	S	N	S	C	R	H	R	G	A	L	V	C	R	A	E	M	G	N	T	A	H	F	Q	C	P	Y	H	G	W	V	Y	S	N	T
PhdA	G	S	V	R	A	M	A	N	S	C	R	H	R	G	T	L	L	C	R	T	E	A	G	N	T	S	H	F	R	C	P	Y	H	G	W	T	Y	K	N	T
NdoB	G	S	I	R	A	F	L	N	V	C	R	H	R	G	K	T	L	V	S	V	E	A	G	N	A	K	G	F	V	C	S	Y	H	G	W	G	F	G	S	N

**Figure 3-1** Alignement de séquences polypeptidiques de sous-unités  $\alpha$  de 5 dioxygénases dans une région partiellement conservée. La portion de séquence montrée correspond au domaine de liaison du centre [2Fe-2S] de type Rieske, dont la séquence consensus est CXHX<sub>15-17</sub>CXXH. BphA: biphényle 2,3-dioxygénase de *Burkholderia cepacia* (P37333), TodC1 : toluène dioxygénase de *Pseudomonas putida* F1 (AAA26005), NidA : dioxygénase de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AAT51751), PhdA : phenanthrène dioxygénase de *Nocardioides* sp. KP7 (BAA94708), NdoB : naphtalène dioxygénase de *Pseudomonas putida* NCIB9816 (P23094).

Des séquences d'ADN susceptibles de porter le gène *pdoA1* ou des gènes homologues ont été recherchées par hybridation de type Southern en utilisant la sonde pdoA. L'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 a donc été digéré par les enzymes de restriction *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI* et *SmaI*. Les fragments obtenus ont été séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose puis analysés par Southern blot (figure 3-2) en utilisant le fragment pdoA comme sonde nucléotidique.



**Figure 3-2** - Hybridation de type Southern avec la sonde pdoA. 1 µg d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été digéré par : 1- *EcoRI*, 2- *EcoRV*, 3- *HindIII*, 4- *BamHI*, 5- *PstI*, 6- *SmaI*. Le marqueur de taille est le Marker 2-DIG labeled (Roche).

L'analyse de l'hybridation fait ressortir que *EcoRI* et *EcoRV* génèrent deux fragments de restriction reconnus par la sonde. En supposant que la digestion de l'ADN génomique était complète, ce résultat suggère l'existence de deux séquences différentes ayant une homologie avec la sonde qui pourrait s'expliquer par la présence de deux gènes homologues. Les enzymes *BamHI* et *SmaI* génèrent toutes deux des fragments s'hybridant avec la sonde de tailles semblables. *SmaI* générant des extrémités franches, plus difficiles à cloner, on retiendra que le fragment le plus propice à un clonage aisé est celui généré par *BamHI*. La banque d'ADN génomique sera donc réalisée avec l'enzyme *BamHI* ou avec une enzyme générant des extrémités compatibles.

## **B. Construction d'une banque d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1**

Afin de cloner facilement des gènes à partir de l'ensemble du génome d'un organisme, la méthode la plus répandue consiste à créer une banque d'ADN génomique de cet organisme. L'ADN est fragmenté par hydrolyse enzymatique à l'aide d'une enzyme de restriction, puis cloné dans un vecteur pour être finalement introduit dans des cellules hôtes, la plupart du temps des bactéries.

Le vecteur  $\lambda$ -ZAP express a été utilisé après plusieurs tentatives infructueuses de construction d'une banque dans le cosmide, SuperCos1. Ce dérivé du phage lambda est

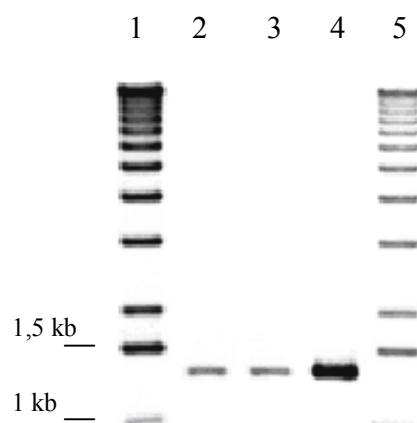
digéré par *Bam*HI et traité à la CIAP. Il permet de cloner des fragments de taille maximale 12 kb.

L'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été digéré par l'enzyme de restriction *Bam*HI pendant 15 min à 37°C, conditions permettant d'isoler des fragments dans une gamme de 0,5 à 12 kb. J'ai réalisé une digestion enzymatique ménagée de 10 µg d'ADN en présence de 6 U de *Bam*HI pendant 1 h à 37°C.

Les fragments obtenus ont été reliés par ligation aux deux brins d'ADN constitutifs du phage. Le mélange de ligation obtenu a ensuite été encapsidé, formant des phages recombinants prêts à transfecter.

Pour déterminer le titre de la banque, des dilutions successives des phages ou des phagemides, réalisées en duplicat, ont servi à transfecter les souches hôtes adéquates. La concentration en phages recombinants a été déterminée à 1200 pfu/µL. Celle de clones de *E. coli* recombinants a été déterminée à  $2,8 \cdot 10^5$  cfu/µL. La banque d'ADN génomique a ensuite été étalée sur boîtes de LB de façon à individualiser 2496 clones de *E. coli* dans des plaques de microtitration contenant 100 µL de LB. Ainsi, une grande partie du génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1 était représentée sous forme d'inserts dans des phagemides.

### C. Clonage des gènes *pdoB1A1*



**Figure 3-3** – Vérification de la présence de *pdoAI* dans la banque d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1. Les produits de PCR ont été séparés sur un gel d'agarose 0,8%. Ils ont été obtenus en utilisant comme

matrice l'ADN cloné dans le phage  $\lambda$  (puits 2), dans le phagemide (puits 3) ou l'ADN génomique (puits 4). Le marqueur de taille, le 1kb DNA ladder (promega) a été déposé dans les puits 1 et 5.

Le fragment de 372 pb décrit précédemment (1A) représente la partie 5' d'un gène de dioxygénase de la souche 6PY1. Alors que j'avais entrepris le clonage de ce gène, une séquence présentant 98% d'identité avec ce fragment de 372 pb a été publiée. Cette séquence code pour le gène *nidA* (pour naphtalene inducible dioxygénase) de la bactérie *Mycobacterium* sp. PYR-1, capable de dégrader le pyrène (Khan *et al.*, 2001).

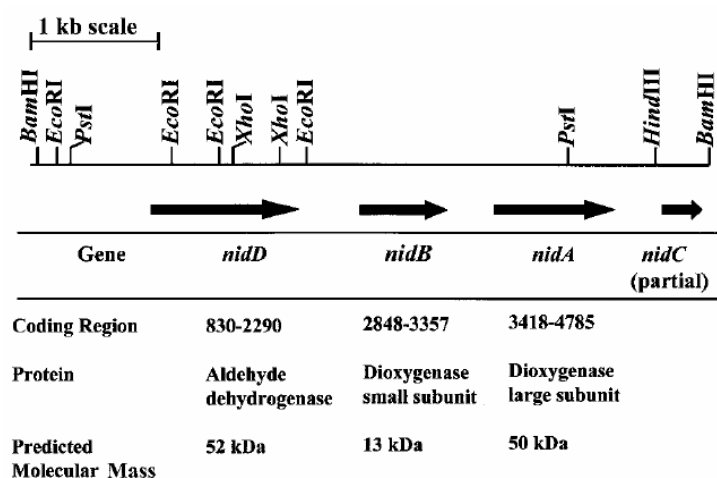


Figure 3-4 - Organisation des gènes *nid* de *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Khan *et al.*, 2001)

La similitude de séquence était telle entre la portion 5' du gène de souche 6PY1 et la partie correspondante de *nidA* de la souche PYR-1, que j'ai essayé d'amplifier par PCR les gènes homologues de *nidA* et *nidB*.

En utilisant les couples d'oligonucléotides pdoA1-F-*NdeI* / pdoA1-R-*EcoRV* et pdoB1-F-*NdeI* / pdoB1-R-*BamHI*, conçus d'après les séquences *nidA* et *nidB*, j'ai amplifié deux fragments dont les tailles correspondaient à celles attendues (~1,4 et 0,5 kb)(figure 3-3). Ces fragments ont été clonés dans pCR-Script en y introduisant des sites pour les enzymes de restriction *NdeI* et *BamHI* en 5' et en 3' respectivement (plasmides pSKU03 et pSKU04), pour faciliter le sous-clonage ultérieur dans des vecteurs d'expression.

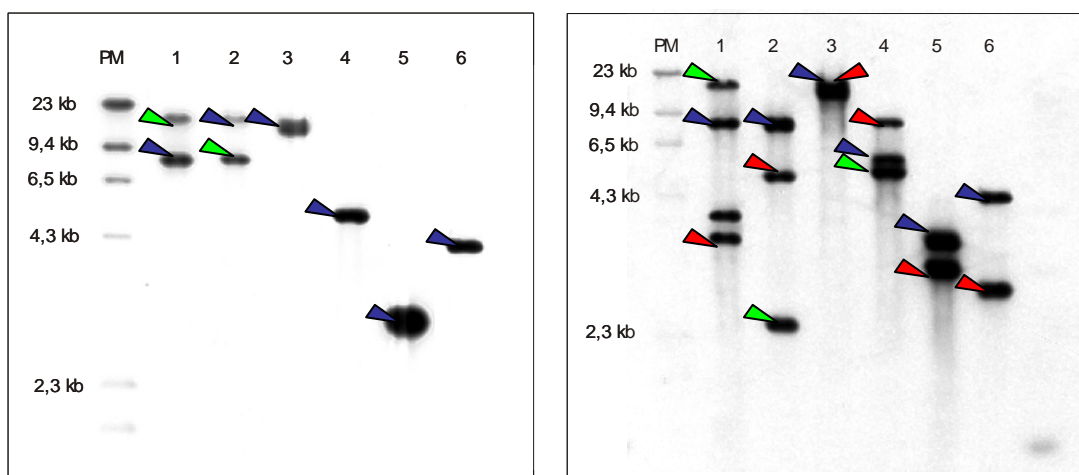
La détermination de la séquence nucléotidique des fragments clonés dans pSKU03 et pSKU04 a confirmé qu'il s'agissait bien de gènes codant les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'une dioxygénase. Ces gènes ont été appelés *pdoA1* et *pdoB1*.

La présence du gène *pdoA1* dans la banque d'ADN génomique a été testée par PCR à l'aide des oligonucléotides pdoA1-F et pdoA1-R. La séparation des produits d'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose a mis en évidence un fragment de 1,4 kb identique à celui obtenu à partir de l'ADN génomique (figure 3-3). Cela apporte la preuve que la banque d'ADN génomique, tant sous forme de phages que sous forme de phagemides, contient bien le gène *pdoA1*.

Le gène *pdoA1* a une taille de 1377 pb. Le polypeptide qui en est déduit a une masse prédite de 50,4 kDa pour 459 résidus. Les acides aminés ligands du centre [2Fe-2S] de type Rieske et ceux du fer mononucléaire, conservés au sein des sous-unités  $\alpha$  de dioxygénases, se retrouvent également dans la séquence polypeptidique déduite de *pdoA1*. Le gène *pdoB1*, d'une taille de 512 pb, code pour un polypeptide de 169 acides aminés dont la masse prédite est de 19,6 kDa.

#### **D. Existence de plusieurs copies des gènes *pdoA1* et *pdoB1* dans le génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1**

Des analyses de l'ADN génomique de la souche 6PY1 par hybridation Southern ont été réalisées avec les sondes spécifiques de *pdoA1* ou *pdoB1* (figure 3-5). Les résultats obtenus montrent que plusieurs fragments de restrictions sont détectés, suggérant qu'au moins deux copies de ces gènes sont présentes dans le génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1. L'hybridation avec *pdoB1* donne plus de bandes que celle avec *pdoA1* indiquant qu'il existe jusqu'à trois copies du gène *pdoB1*, ayant des séquences identiques ou très voisines.



**Figure 3-5** - Hybridations de type Southern avec la sonde *pdoAI* (à gauche) et *pdoBI* (à droite). 1µg d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été digéré par : 1- *EcoRI*, 2- *EcoRV*, 3- *HindIII*, 4- *BamHI*, 5- *PstI*, 6- *SmaI*. Le marqueur de taille est le « DIG-labeled marker 2 ». Les flèches bleues indiquent les fragments contenant *pdoAI* (gauche) ou *pdoBI* (droite), les rouges indiquent ceux qui contiennent l'équivalent à *nidB2*, les vertes indiquent les fragments qui n'ont pu être identifiés.

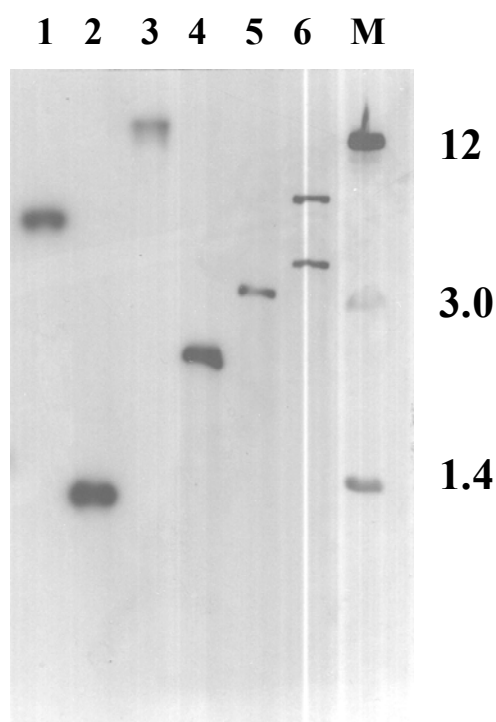
## E. Détection et clonage des gènes codant pour une deuxième arène dioxygénase (*pdo2*)

### 1. Détection d'un gène de structure d'une deuxième arène dioxygénase

La mise en évidence d'un polypeptide ressemblant à une sous-unité  $\beta$  d'arène dioxygénase (P8) indiquait l'existence d'une deuxième enzyme de ce type, distincte de Pdo1, dans la souche 6PY1. A partir des éléments de séquence N-terminale et interne du polypeptide P8 (Tableau 1-4), des oligonucléotides spécifiques ont été conçus (P10F et P10R respectivement) et ont servi à amplifier par PCR un fragment de 270 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pGEM-T easy puis séquencé. La séquence en acides aminés déduite correspondait effectivement à la partie N-terminale d'une sous-unité  $\beta$  d'arène dioxygénase.

Des expériences d'hybridation Southern ont alors été réalisées avec l'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 digéré par différentes enzymes de restriction en utilisant un fragment de 1,4 kb à cheval sur *pdoA2* et *pdoB2*, obtenu par PCR, comme sonde (figure 3-6).





**Figure 3-6** Détection par hybridation Southern d'un gène codant pour une deuxième arène dioxygénase dans le génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1. 1 µg d'ADN génomique de *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été digéré par : 1- *EcoRI*, 2- *EcoRV*, 3- *HindIII*, 4- *BamHI*, 5- *PstI*, 6- *SmaI*, M – Marqueurs de taille 1kb DNA ladder + fragment de 1,4 kb contenant les régions 3' de *pdoA2* et 5' de *pdoB2* puis séparé par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. L'hybridation a été faite avec la sonde P10A de 1,4 kb.

Un fragment *BamHI* d'environ 2,5 kb a été détecté. Ce fragment a donc été recherché dans la banque d'ADN génomique par une méthode de criblage par PCR.

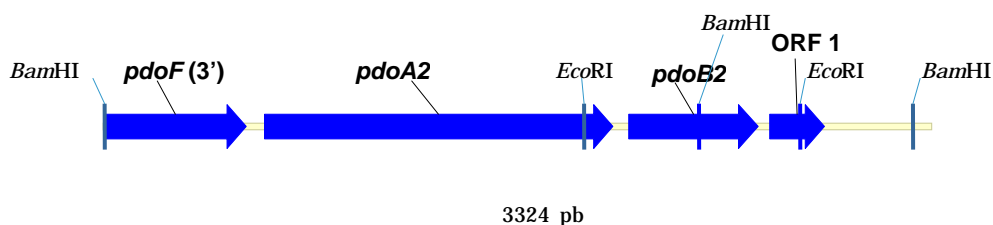
## 2. Isolement d'un clone de la banque d'ADN génomique possédant les gènes codant la dioxygénase Pdo2

Les clones de la banque d'ADN génomique, répartis dans 26 boîtes de 96 puits ont été répliqués sur des boîtes de milieu LB gélosé. Les colonies ont ensuite été regroupées selon leur boîte d'origine de manière à cribler la banque de clones par lots de 96 clones en employant la méthode de PCR sur colonies avec les amorces spécifiques du fragment P10A de 270 pb. A l'issue de cette première sélection, cinq boîtes ont montré la présence d'un fragment de taille attendue. Deux de ces boîtes ont été sélectionnées afin d'isoler un clone d'intérêt. Pour cela, les clones des lignes et des colonnes des boîtes ont

été regroupés puis criblés par PCR sur colonies. Ainsi, deux clones positifs ont été isolés à l'intersection des lignes et des colonnes.

L'analyse de restriction a montré que les deux clones contenaient un fragment *Bam*HI de même taille, dont la longueur, approximativement 2,4 kb, était semblable à celle du fragment *Bam*HI détecté par hybridation (Fig 3-6). L'analyse de la séquence nucléotidique de ce fragment (clone P10A10/5B) indique la présence de trois gènes correspondant à la partie 3' d'une extradiol dioxygénase (*pdoF*), à une sous-unité  $\alpha$  de dioxygénase (*pdoA2*) et à la partie 5' d'une sous-unité  $\beta$  de dioxygénase (*pdoB2*) (figure 3-7).

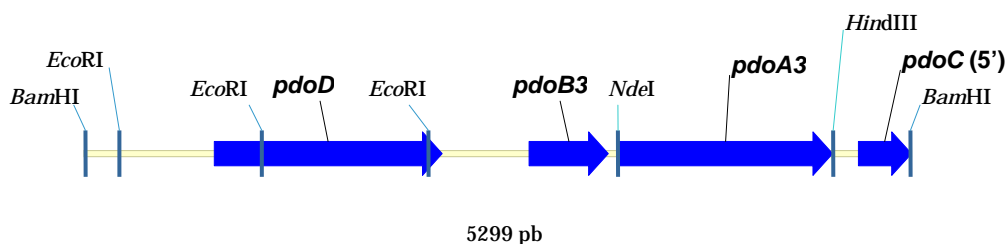
La séquence obtenue rappelle celle de l'opéron *phd* de dégradation du phénanthrène par *Nocardioïdes* sp. KP7 (Saito *et al.*, 2000). Cette bactérie présente un arrangement des gènes *phd* proche de celui observé pour les gènes *pdo2* chez *Mycobacterium* sp. 6PY1. C'est ainsi qu'en fin d'opéron *phd* se trouvent les gènes codant les transporteurs d'électrons, ferrédoxine et réductase. Un oligonucléotide a donc été réalisé à partir d'une séquence consensus identifiée par alignement de séquences de réductases intervenant dans l'oxydation de HAP (voir Fig. 3-15). Cet oligonucléotide, REDCONS1, a été utilisé avec l'oligonucléotide P10F (séquence 5' de *pdoB2*) afin d'amplifier par PCR la séquence située en aval de *pdoB2*. J'ai ainsi obtenu un fragment de 930 pb contenant la partie 3' du gène *pdoB2* ainsi qu'un cadre de lecture, appelé ORF1 (figure 3-7). ORF1 a une taille de 219 pb et sa séquence en acides aminés déduite présente 83% d'identité avec l'ORF72 de l'opéron *phd* de *Nocardioïdes* sp. KP7.



**Figure 3-7** – Carte du locus contenant les gènes *pdoA2B2* de *Mycobacterium* sp. 6PY1

## F. Détection et clonage des gènes *pdoB3A3* codant une troisième arène dioxygénase

Afin d'isoler un clone possédant les séquences d'autres gènes cataboliques situés au voisinage des gènes *pdoA1* et *pdoB1*, la banque d'ADN génomique a été criblée par PCR en utilisant les oligonucléotides K15 et nidB-R encadrant le gène *pdoB1*. Un seul clone a été isolé, portant un insert dont la taille de 5,3 kb est en accord avec celle du fragment détecté par hybridation (Fig 3-5). La séquence nucléotidique comporte 4 cadres de lecture ouverts : *pdoD* codant une aldéhyde deshydrogénase, *pdoB3* codant une sous-unité  $\beta$  de dioxygénase, *pdoA3* codant une sous-unité  $\alpha$  de dioxygénase et la partie 5' de *pdoC* codant une deshydrogénase (figure 3-8). Il s'agissait d'une nouvelle dioxygénase, dont la séquence et l'arrangement des gènes étaient très proches de ceux trouvés dans le locus contenant *pdoB1A1*.



**Figure 3-8** – Carte du locus contenant les gènes *pdoB3A3* de *Mycobacterium* sp. 6PY1

Les gènes *pdoA3* et *pdoB3* ont été amplifiés séparément par PCR avec les couples d'oligonucléotides PdoA3-F / PdoA3-R et PdoB3-F / PdoB3-R respectivement, pour être clonés dans pDrive ; ils ont ensuite été insérés entre les sites *NdeI* et *BamHI* de pET9a et de pET15b formant les plasmides pPDO3 et pEHPDO3

## G. Analyse des séquences des gènes *pdo*

Les gènes *pdoB1A1* et *pdoB3A3* ressemblent tant dans leur séquence que dans leur organisation aux gènes *nid* des bactéries *Mycobacterium vanbaalenii* sp. PYR-1 (Khan *et al.*, 2001, Stingley *et al.*, 2004) et *Mycobacterium* sp.S65 (Sho *et al.*, 2004) qui

possèdent aussi la capacité de croître sur pyrène. Il existe cependant de légères différences de séquence entre ces gènes ainsi qu'entre leurs produits d'expression (Tableau 3-1). Les gènes *pdoA2B2* présentent une forte similitude de séquence avec les gènes *phdAB* de *Nocardioide* sp. KP7 (Saito *et al.*, 2000).

Le gène *pdoD* identifié sur le locus *pdo3* présente 99 % d'identité de séquence avec son homologue de la souche *Mycobacterium* sp. PYR-1. D'après les comparaisons de séquence, il s'agirait du gène codant une aldéhyde déshydrogénase. La séquence en acides aminés déduite indique que le produit de *pdoD* correspond au polypeptide P22 identifié dans des extraits de 6PY1 par électrophorèse bidimensionnelle (Krivobok *et al.*, 2003).

**Tableau 3-1** Caractéristiques des gènes *pdo* et de leurs produits (prédictions) ISP désigne la composante terminale des dioxygénases ou Iron Sulfur Protein. *pdoC* n'apparaît pas car sa séquence complète n'a pas été obtenue.

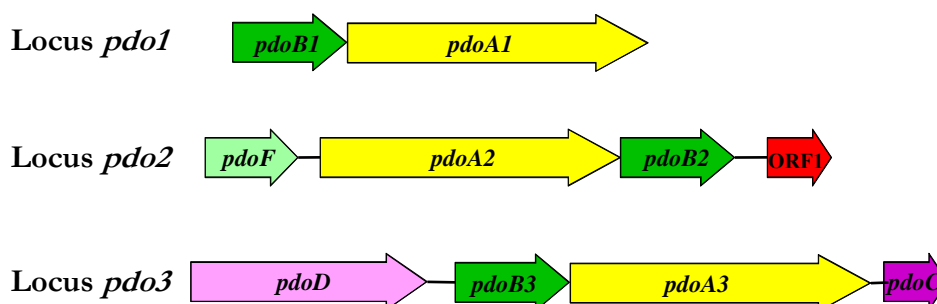
Gène	%GC	Taille (pb)	Protéine	Résidus aa	Masse mol. (Da)	Charge	pI
<i>pdoA1</i>	63	1377	ISP $\alpha$	459	50488	-20	5,17
<i>pdoB1</i>	64	510	ISP $\beta$	170	19557	-8	4,97
<i>pdoA2</i>	60	1401	ISP $\alpha$	467	51907	-15	5,22
<i>pdoB2</i>	61	519	ISP $\beta$	173	20045	-9	5,31
<i>pdoA3</i>	63	1377	ISP $\alpha$	459	50548	-19	5,23
<i>pdoB3</i>	64	510	ISP $\beta$	170	19577	-7	5,06
<i>pdoD</i>	64	1461	Aldéhyde déshydrogénase	487	51975	-17	4,94

## H. Discussion

### 1. *Mycobacterium* possède trois arène dioxygénases

La première étape de ce travail a consisté à cloner les gènes de dioxygénases induites spécifiquement par le pyrène. Deux loci ont ensuite été identifiés comportant les gènes codant une dioxygénase. Un autre locus a été mis en évidence qui comporte 4 gènes: *pdoD*, *pdoB3*, *pdoA3* et *pdoC* (Figure 3-9). Les gènes *pdoB3* et *pdoA3* sont très proches des gènes *pdoB1* et *pdoA1*. De plus, leur organisation rappelle celle des gènes *nid* de la bactérie *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Stingley *et al.*, 2004). Le gène *pdoC* homologue de *nidC*, codant pour une alcool deshydrogénase est également présent. L'identité de séquence entre le locus *pdo3* et son homologue chez PYR-1 atteint

98,7%. La très grande similarité dans les séquences des gènes *pdoB1A1* et celle des gènes *pdoB3A3* suggère que ces deux copies seraient le fruit d'une duplication.



**Figure 3-9** - Représentation schématique des gènes sur les trois loci *pdo*

La comparaison des séquences protéiques de Pdo1 et Pdo3 avec les séquences disponibles dans les bases de données montre que les dioxygénases de deux autres espèces de *Mycobacterium*, sp. PYR-1 et sp. S65, sont les plus proches (98,3% et 98,7% respectivement pour les sous-unités  $\alpha$  ; Tableau 3-3). Dans ces deux souches, les gènes des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont dans l'ordre inverse de celui habituellement rencontré dans les bactéries qui dégradent les hydrocarbures aromatiques. Cette organisation est toutefois retrouvée dans une autre espèce de bactérie, *Sphingomonas* sp. CHY-1, isolée au laboratoire pour sa capacité à métaboliser le chrysène (Demanèche *et al.*, 2004).

La comparaison des séquences protéiques des sous-unités  $\alpha$  de Pdo1, Pdo2 et Pdo3 avec celle de la sous-unité  $\alpha$  de la naphthalène dioxygénase dont la structure a été résolue montre la conservation des acides aminés ligands du centre fer-soufre ainsi que du fer mononucléaire. Elle fait également apparaître que, sur les 17 résidus de la poche de liaison du substrat de la naphthalène dioxygénase impliqués dans la sélectivité, 8 sont conservés entre ces dioxygénases (figure 3-10).

Il y a très peu de différences entre PdoB1 et PdoB3 : seuls trois acides aminés contigus diffèrent entre les deux sous-unités  $\beta$ , il s'agit de Glu106, Ala107 et Asp108 remplacés respectivement par les résidus Gly, Thr et Glu. Un modèle structural de ces deux sous-unités  $\beta$  a été construit avec les logiciels disponibles sur le serveur SWISS-MODEL (Schwede *et al.*, 2003) en prenant la naphthalène dioxygénase comme référence. Ce modèle situe les trois acides aminés différents sur une boucle (figure 3-11) localisée sur la partie inférieure de l'hétérohexamère.

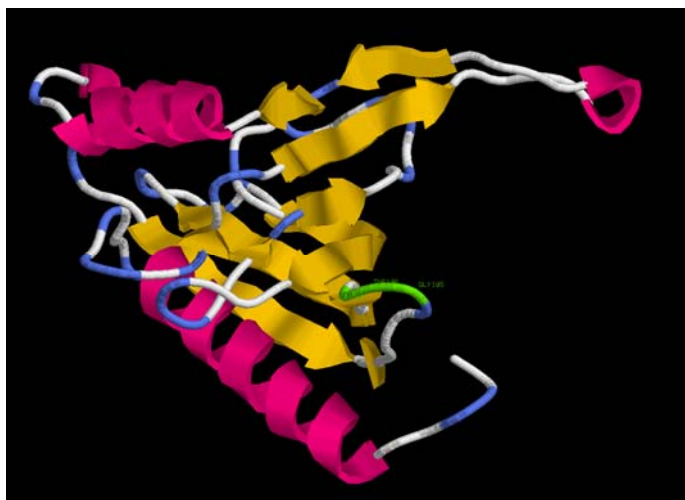
		1		80
NdoB	(1)	-----MN <sup>↓</sup> YNNKILVS-ES <sup>↓</sup> GLSQKHL-- <sup>↓</sup> THGDEELFQHELKTIFARMW <sup>↓</sup> FLTH <sup>↓</sup> SLIPAPGDYV <sup>↓</sup> TAKMGI		
PdoA2	(1)	-----M <sup>↓</sup> STVGKNDIQQLVAAGREGLAKGR <sup>↓</sup> LPAGLVANAELHKLEAQRVFGRCWQFLA <sup>↓</sup> ETEIPQAGDYV <sup>↓</sup> VRYLGG		
PdoA1	(1)	MQTETTTTGTADATD <sup>↓</sup> YLRRALREVADGLKVGRLPARVYSDPALHTIEMERIFGRAWVFLGHESELAKSGD <sup>↓</sup> FVVRHIGA		
PdoA3	(1)	MTTETTTTGTADATD <sup>↓</sup> YLRRALREVADGLKVGRLPARVYSDPALHTIEMERIFGRAWVFLGHESELAKSGD <sup>↓</sup> FVVRHIGA		
		81		160
NdoB	(62)	DEVIVSRQNDG <sup>↓</sup> SIRAF <sup>↓</sup> LVCRHRGKTLVSV <sup>↓</sup> EAGNAKGFVCSYHGWG <sup>↓</sup> GSNGELQSVF <sup>↓</sup> FEKDL <sup>↓</sup> YGESLNK <sup>↓</sup> KCLGLKEV <sup>↓</sup> ARV		
PdoA2	(71)	GSIIIVVRGEDGEV <sup>↓</sup> RAMAN <sup>↓</sup> SCRHRGTMLCRTE <sup>↓</sup> MGN <sup>↓</sup> TS <sup>↓</sup> SHFRCPYHGW <sup>↓</sup> TVRNTGTLA <sup>↓</sup> GVPAQKEV <sup>↓</sup> YGVEMDK <sup>↓</sup> NEW <sup>↓</sup> SLTQV <sup>↓</sup> PRL		
PdoA1	(81)	DSVIVCRD <sup>↓</sup> NSGRIQALSN <sup>↓</sup> SCRHRGALVCRAEMGNTAH <sup>↓</sup> FQCPYHGWVYSNTGELVGV <sup>↓</sup> PAMSEAY <sup>↓</sup> PGGFDK <sup>↓</sup> SQWGLR <sup>↓</sup> HIEHV		
PdoA3	(81)	DSVIVCRD <sup>↓</sup> NSGRIQALSN <sup>↓</sup> SCRHRGALVCRAEMGNTAH <sup>↓</sup> FQCPYHGWVYSNTGELVGV <sup>↓</sup> PAMSEAY <sup>↓</sup> PGGFDK <sup>↓</sup> SQWGLR <sup>↓</sup> HIEHV		
		161		240
NdoB	(142)	ES <sup>↓</sup> THGFIYGC <sup>↓</sup> FDQEA <sup>↓</sup> PPLMDYLGDAAMYLEP <sup>↓</sup> MFHS- <sup>↓</sup> GGLELVGP <sup>↓</sup> PGV <sup>↓</sup> VVIKANWKAP <sup>↓</sup> AENFVGDA <sup>↓</sup> YHVG <sup>↓</sup> WTHAS <sup>↓</sup> SLRS <sup>↓</sup> G		
PdoA2	(151)	ENVRGMIFGCLDE <sup>↓</sup> KAEP <sup>↓</sup> VDYLGDMAM <sup>↓</sup> YLDLITQKSKGGLEV <sup>↓</sup> RGE <sup>↓</sup> PQRWIDSNWKL <sup>↓</sup> GADNFVGDA <sup>↓</sup> YHTL <sup>↓</sup> MT <sup>↓</sup> HRS <sup>↓</sup> AVEL <sup>↓</sup> G		
PdoA1	(161)	DSYAGYIFG <sup>↓</sup> SVDPKAPSLTDYLGDTTFYLDLIAKKTAGGLE <sup>↓</sup> VIGAPH <sup>↓</sup> LWVMSANWKTAA <sup>↓</sup> DNFVGDSYHTL <sup>↓</sup> FAHRS <sup>↓</sup> MVEL <sup>↓</sup> G		
PdoA3	(161)	DSYAGYIFG <sup>↓</sup> SVDPKAPSLTDYLGDTTFYLDLIAKKTAGGLE <sup>↓</sup> VIGAPH <sup>↓</sup> LWVMSANWKTAA <sup>↓</sup> DNFVGDSYHTL <sup>↓</sup> FAHRS <sup>↓</sup> MVEL <sup>↓</sup> G		
		241		320
NdoB	(221)	ESIFSSLAGN <sup>↓</sup> ALPPEGAGLQMTSKYSS <sup>↓</sup> GMGVLDWGY <sup>↓</sup> -----GVHSADLVPELMAFGGAKQERL <sup>↓</sup> NKEIGD <sup>↓</sup> VRARI <sup>↓</sup> Y		
PdoA2	(231)	-----LAP <sup>↓</sup> DPKFA <sup>↓</sup> SEPAHISLSNGHGLGVL <sup>↓</sup> GVTPGQP-M <sup>↓</sup> PPFMN <sup>↓</sup> YF <sup>↓</sup> PEVVDGLAAAYGDQDRADML <sup>↓</sup> QSAF <sup>↓</sup> IHGTV <sup>↓</sup> F		
PdoA1	(241)	-----MAPGDPNSASAPAEISLQNGHGV <sup>↓</sup> GVLGFPPTLADFP <sup>↓</sup> EYEGYP <sup>↓</sup> DEVVDQMATSY <sup>↓</sup> PSVHKDLMRRSAF <sup>↓</sup> IHGTV <sup>↓</sup> F		
PdoA3	(241)	-----MAPGDPNFASAPAEISLQNGHGV <sup>↓</sup> GVLGFPPTLADFP <sup>↓</sup> EYEGYP <sup>↓</sup> DEVVDQMATSY <sup>↓</sup> PSVHKDLMRRSAF <sup>↓</sup> IHGTV <sup>↓</sup> F		
		321		400
NdoB	(293)	R--SHLNC <sup>↓</sup> TYFEN-NSMLTCSGV <sup>↓</sup> FKVMNPIDANT <sup>↓</sup> TEVWTYAI <sup>↓</sup> VEKDM <sup>↓</sup> FDLKRRLADSV <sup>↓</sup> QRTFG <sup>↓</sup> PAGF <sup>↓</sup> WESDDND <sup>↓</sup> NMETA		
PdoA2	(303)	PNLSFLNVLIG <sup>↓</sup> RDKKSMPV <sup>↓</sup> PMLTFR <sup>↓</sup> LWRPLSHDIMEVWSWFL <sup>↓</sup> VEKDA <sup>↓</sup> DEFKQQSYET <sup>↓</sup> YVRTFG <sup>↓</sup> ISGV <sup>↓</sup> FEQDDAE <sup>↓</sup> TWRS <sup>↓</sup> I		
PdoA1	(314)	PNLSFINVTIAPDHMS <sup>↓</sup> PPTPFIT <sup>↓</sup> FRVWHPLSHDRMEILSWFL <sup>↓</sup> VERDAPE <sup>↓</sup> WLRDASQASVYNNF <sup>↓</sup> GP <sup>↓</sup> GVFEQDDAE <sup>↓</sup> AWKAI		
PdoA3	(314)	PNLSFINVTIAPDHMS <sup>↓</sup> PPTPFIT <sup>↓</sup> FRVWHPLSHDRMEILSWFL <sup>↓</sup> VERDAPE <sup>↓</sup> WLRDASQASVYNNF <sup>↓</sup> GP <sup>↓</sup> GVFEQDDAE <sup>↓</sup> AWKAI		
		401		480
NdoB	(370)	SQNGKKYQSR <sup>↓</sup> SDLLSN <sup>↓</sup> IGFGEDVYGD <sup>↓</sup> AV-Y <sup>↓</sup> PGVVGKSAI <sup>↓</sup> GETSYR <sup>↓</sup> GFRAYQA <sup>↓</sup> HYSS <sup>↓</sup> SNWAEFEHASSTW <sup>↓</sup> HTELTK <sup>↓</sup> TTDR---		
PdoA2	(383)	TAGTQ <sup>↓</sup> GILAGSQT <sup>↓</sup> LN <sup>↓</sup> FEMGMGVLTSDDTWK <sup>↓</sup> GPGR <sup>↓</sup> LSSGYAERN <sup>↓</sup> QREFWGR <sup>↓</sup> LELLTD <sup>↓</sup> SGDDA <sup>↓</sup> SETEPK <sup>↓</sup> PQLLAQ <sup>↓</sup> SRTNADEVA		
PdoA1	(394)	TESVQGP <sup>↓</sup> FAGEGL <sup>↓</sup> LN <sup>↓</sup> YEMGMDLTPLTD <sup>↓</sup> WF-G <sup>↓</sup> PGEALPSGYAERN <sup>↓</sup> QRRF <sup>↓</sup> WGRWLE <sup>↓</sup> YMGQ <sup>↓</sup> PPAFGGRA-----		
PdoA3	(394)	TESVQGP <sup>↓</sup> FAGEGL <sup>↓</sup> LN <sup>↓</sup> YEMGMDLTPLTD <sup>↓</sup> WF-G <sup>↓</sup> PGEALPSGYAERN <sup>↓</sup> QRRF <sup>↓</sup> WGRWLE <sup>↓</sup> YMGQ <sup>↓</sup> PPAFGGRA-----		

**Figure 3-10** Comparaison des séquences peptidiques des sous-unités  $\alpha$  de la naphtalene dioxygénase (NdoB) et de Pdo1, Pdo2 et Pdo3. Les acides aminés ligands des centres fer-soufre et de l'atome de fer, qui restent conservés, sont indiqués par des flèches rouges. Les résidus sur fond jaunes sont conservés, ceux sur fond bleu sont partiellement conservés et ceux sur fond vert sont similaires.

Pour déterminer le rôle des sous-unités  $\beta$  des dioxygénases Pdo1, Pdo2 et Pdo3, l'échange de sous-unités  $\beta$  peut être envisagé. Ainsi, la formation de complexes  $\alpha_3\beta_3$  avec des sous-unités des différentes dioxygénases Pdo de *Mycobacterium* sp. 6PY1 et l'observation de la sélectivité et des activités vis-à-vis des HAP pourrait donner un rôle autre que purement structural aux sous-unités  $\beta$ .

Récemment, l'équipe de Cerniglia a publié une séquence de 37 kb provenant de *Mycobacterium vanbaalenii* sp. PYR-1, contenant notamment les gènes *nid* (figure 3-13) (Stingley *et al.*, 2004). Cette séquence fait notamment apparaître une deuxième sous-unité  $\beta$  très proche de *nidB*, nommée *nidB2*. La séquence polypeptidique de *nidB2* ne diffère de celle de *nidB* que par un acide aminé : un résidu glutamate en position 16 y est remplacé par une alanine. La région de 37 kb contient en outre un opéron de dégradation du phthalate, et des gènes *phdF*, *phdI* et *phdJ* dont les produits interviennent dans la voie de dégradation du phénanthrène, à partir du 3,4-dihydroxy-phénanthrène.

En amont de *nidB2*, on trouve un gène de transposase, *tnpD*, et d'autres gènes de transposition (*tnpA*, *tnpB* et *tnpC*) au début de la séquence de 37 kb. La présence de ces gènes de transposases suggère que cette région du génome de *Mycobacterium vanbaalenii* sp. PYR-1 a été réarrangée : *tnpD* se trouve entre les gènes *phd* de dégradation du phénanthrène et les gènes *nid* et pourrait avoir contribué à leur rapprochement.



**Figure 3-11** – Modélisation structurale de la sous-unité  $\beta$  de Pdo1 / Pdo3 d'après la structure tridimensionnelle de la naphthalene dioxygénase. Les trois acides aminés contigus différant entre PdoB1 et PdoB3 sont colorés en vert.

A la lumière des éléments de séquence déterminés chez 6PY1 et de ceux disponibles chez *Mycobacterium* sp. PYR-1, j'ai réinterprété les résultats d'hybridation de type Southern obtenus avec les sondes *pdoA1* et *pdoB1* (figure 3-5). En effet, les hybridations multiples observées avec la sonde *pdoB1* indiquaient que le génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1 contenait de deux à trois copies de ce gène.

L'analyse de la séquence de 37 kb de *Mycobacterium* sp. PYR-1, à l'aide du logiciel Vector NTi, a montré que la taille théorique des fragments de restriction portant *nidB* ou *nidB2* (Tableau 3-2) était voisine de celle des fragments porteurs du gène *pdoB1*, détectés par hybridation Southern.

Les résultats de ces comparaisons suggèrent que l'organisation des gènes *pdoA1/pdoB1* est très voisine de celle des gènes *nidA/nidB* de la souche PYR-1. Ces résultats suggèrent également la présence d'un quatrième gène codant une sous-unité  $\beta$  de dioxygénase, homologue à *nidB2*, située en amont des gènes *pdoB1A1*.

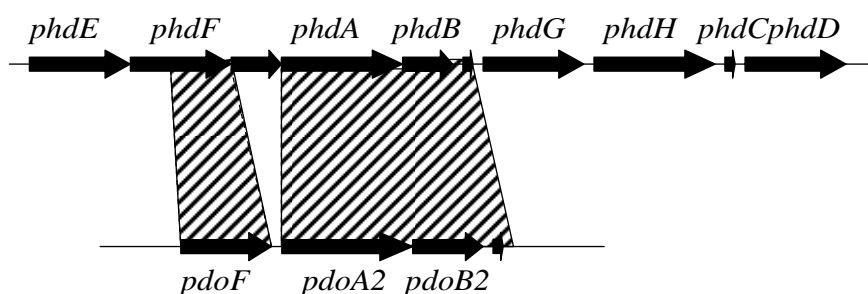
**Tableau 3-2** – Tailles observées et calculées de fragments de restriction porteurs de gènes de type *pdoA1/nidA* ou *pdoB1/nidB* (en paires de bases).

Enzyme de restriction	<i>pdoA1 / nidA</i>		<i>pdoB1 / nidB</i>			
	Obs.	Calc.	<i>1<sup>ère</sup> copie</i>		<i>2<sup>ème</sup> copie</i>	
			Obs.	Calc.	Obs.	Calc.
<i>EcoRI</i>	8 600	8 641	8 600	8 641	3 900	3 990
<i>EcoRV</i>	15 200	14 384	7 400	7 127	4 800	4 908
<i>HindIII</i>	13 300	13 758	13 300	13 758	13 300	13 758
<i>BamHI</i>	5 200	5 282	5 200	5 282	7 400	6 686
<i>PstI</i>	3 000	3 295	4 000	3 949	3 200	3 560
<i>SmaI</i>	4 200	4 458	4 200	4 458	2 800	2 854

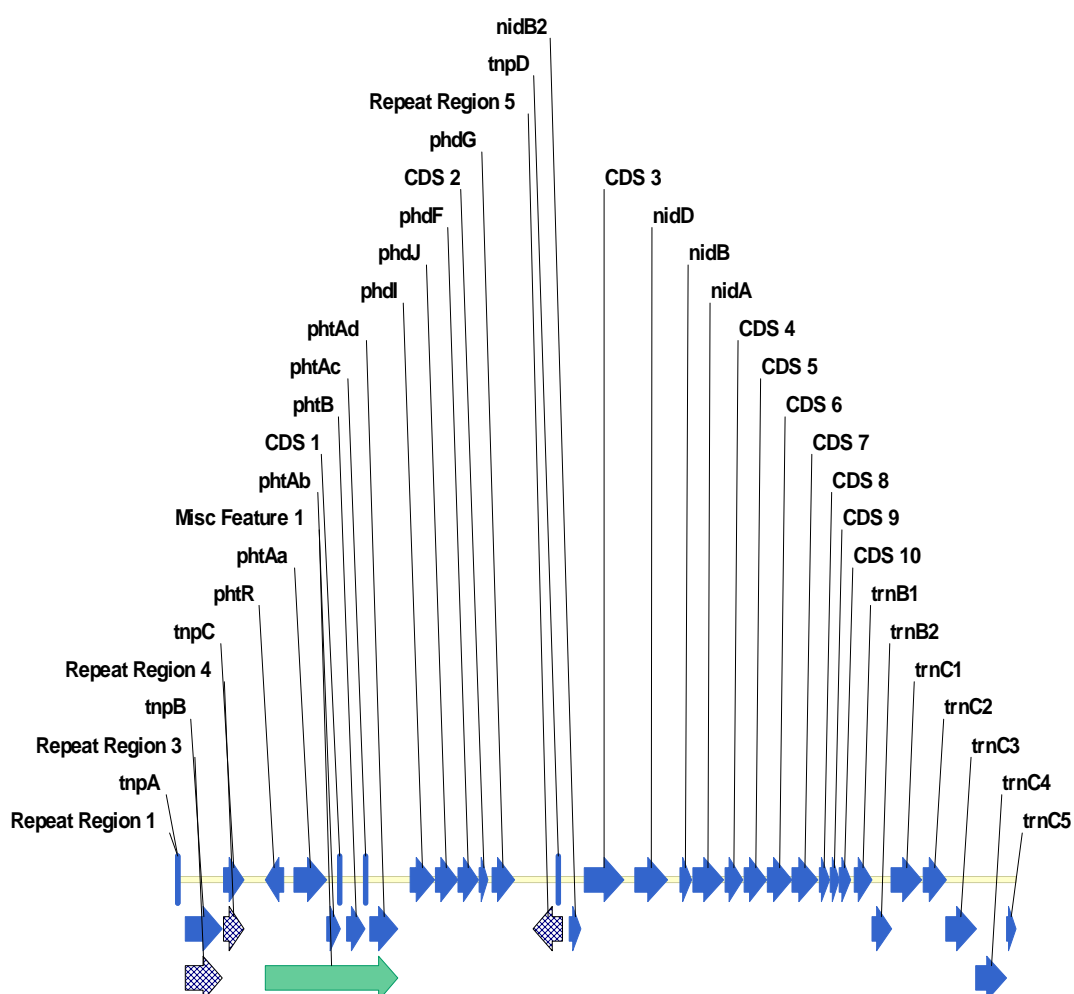
Le séquençage du locus *pdo2* a révélé la présence de 4 gènes, *pdoF*, *pdoA2*, *pdoB2* et l'ORF1, proches, tant par leur organisation que par leur séquence, des gènes de l'opéron *phd* de dégradation du phénanthrène de la bactérie *Nocardioïdes* sp. KP7 (figure 3-12) (Saito *et al.*, 2000). L'ordre des gènes est le même dans les deux bactéries : le gène codant l'extradiol dioxygénase (*phdF/pdoF*), un ORF qui n'est pas retrouvé chez *Mycobacterium* sp. 6PY1, les gènes des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  d'une arène dioxygénase puis un ORF. En revanche, ce qui suit la séquence de l'ORF1 chez 6PY1 ne montre pas de ressemblance avec la séquence en aval de ORF72 de *Nocardioïdes* sp. KP7. En particulier les gènes *phdC* et *phdD* codant une ferrédoxine et une réductase associées à la dioxygénase PhdAB ne sont pas retrouvés à une position équivalente dans le génome de 6PY1.

Les gènes *phd* de *Nocardioïdes* sp. KP7 sont regroupés en cluster alors que leurs homologues chez *Mycobacterium* sont séparés en au moins deux clusters éloignés dans le génome. En effet, on retrouve une partie seulement des gènes homologues dans la souche PYR-1 en amont des gènes *nid* dans la séquence de 37 kb (Stingley *et al.*, 2004). L'autre partie des gènes homologues, identifiés dans le locus *pdo2* de la souche 6PY1 mais pas encore localisés dans la souche PYR-1, ne se trouve pas dans la région de 37 kb et se situent donc ailleurs dans le génome.





**Figure 3-12 :** Comparaison de l'opéron *phd* de *Nocardioideis* sp. KP7 et du locus *pdo2* de *Mycobacterium* sp. 6PY1. La partie hachurée démarque les zones homologues.



**Figure 3-13** – Organisation des gènes de dégradation du phtalate, du phénanthrène et du pyrène chez *Mycobacterium vanbaalenii* sp. PYR-1 (Stingley *et al.*, 2004). Les gènes *pht* codent un opéron de dégradation du phtalate, les gènes *phd* codent des enzymes de dégradation du phénanthrène, les gènes *tnp* codent des éléments transposables, les gènes *nid* sont impliqués dans la dégradation du pyrène et les gènes *trn* codent pour des protéines de transport

## 2. Etude phylogénétique

J'ai sélectionné une trentaine de séquences homologues aux trois dioxygénases de la souche 6PY1 à l'aide du logiciel BLAST et j'ai réalisé des alignements en utilisant ClustalW. Dans cette sélection, on trouve les dioxygénases oxydant les HAP ainsi que des biphenyle dioxygénases et des dioxygénases oxydant des hydrocarbures monoaromatiques tels que le toluène ou le benzène.

J'ai ensuite construit des arbres phylogénétiques à partir des alignements en utilisant les logiciels Vector NTi et TreeTop (figure 3-14). Les dioxygénases Pdo1, Pdo2 et Pdo3 font partie d'un sous-groupe ne contenant que des dioxygénases oxydant les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Pdo2 forme une branche distincte avec PhdAB de *Nocardioides* sp. KP7. Pdo1 et Pdo3 forment avec les dioxygénases de *Mycobacterium* sp. S65 et sp. PYR-1 un groupe très homogène puisque les pourcentages d'identité varient de 97,6% à 100 % (Tableaux 3-3 et 3-4). Dans le même sous-groupe, on trouve des dioxygénases spécifiques du naphthalène. Les autres dioxygénases sont regroupées selon le type de substrat qu'elles reconnaissent. On distingue un sous-groupe contenant des dioxygénases oxydant les hydrocarbures monoaromatiques et un sous-groupe de biphenyle dioxygénases.

Notre analyse conduit à distinguer trois sous-classes de dioxygénases en accord avec le classement proposé par *Nam et al.* (Nam et al., 2001) sur la base de la comparaison des sous-unités  $\alpha$  des dioxygénases.

Les arbres phylogénétiques montrent une séparation des dioxygénases selon la complexité des substrats qu'elles sont capables de reconnaître. Ainsi les dioxygénases oxydant les hydrocarbures monoaromatiques forment un groupe, tout comme celles qui hydroxylent le biphenyle ou encore celles dont les substrats sont des HAP. Les dioxygénases s'attaquant aux HAP montrent une plus grande dispersion que les autres. Ainsi, les sous-unités  $\beta$  PahA4 de la naphthalène dioxygénase de *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 et PhnAd de la phénanthrène dioxygénase de *Burkholderia* sp. RP007 se retrouvent plus près des dioxygénases oxydant les hydrocarbures monoaromatiques que de celles qui hydroxylent les HAP. Ces exceptions suggèrent que certaines enzymes pourraient avoir résulté du rapprochement de gènes de dioxygénases de type monoaromatique avec des gènes de dioxygénases de type HAP.

**Tableau 3-3** – Degré de similitude entre les séquences polypeptidiques des sous-unités  $\alpha$  des dioxygénases de *Mycobacterium* sp. 6PY1 et celles des dioxygénases les plus proches.

	PdoA1	PdoA2	PdoA3	NidA S65	NidA PYR-1	PhdA KP7
PdoA1	100	61,3	99,1	98,3	98,3	68,5
PdoA2		100	61,7	62,3	62,1	78,6
PdoA3			100	98,7	98,7	68,9

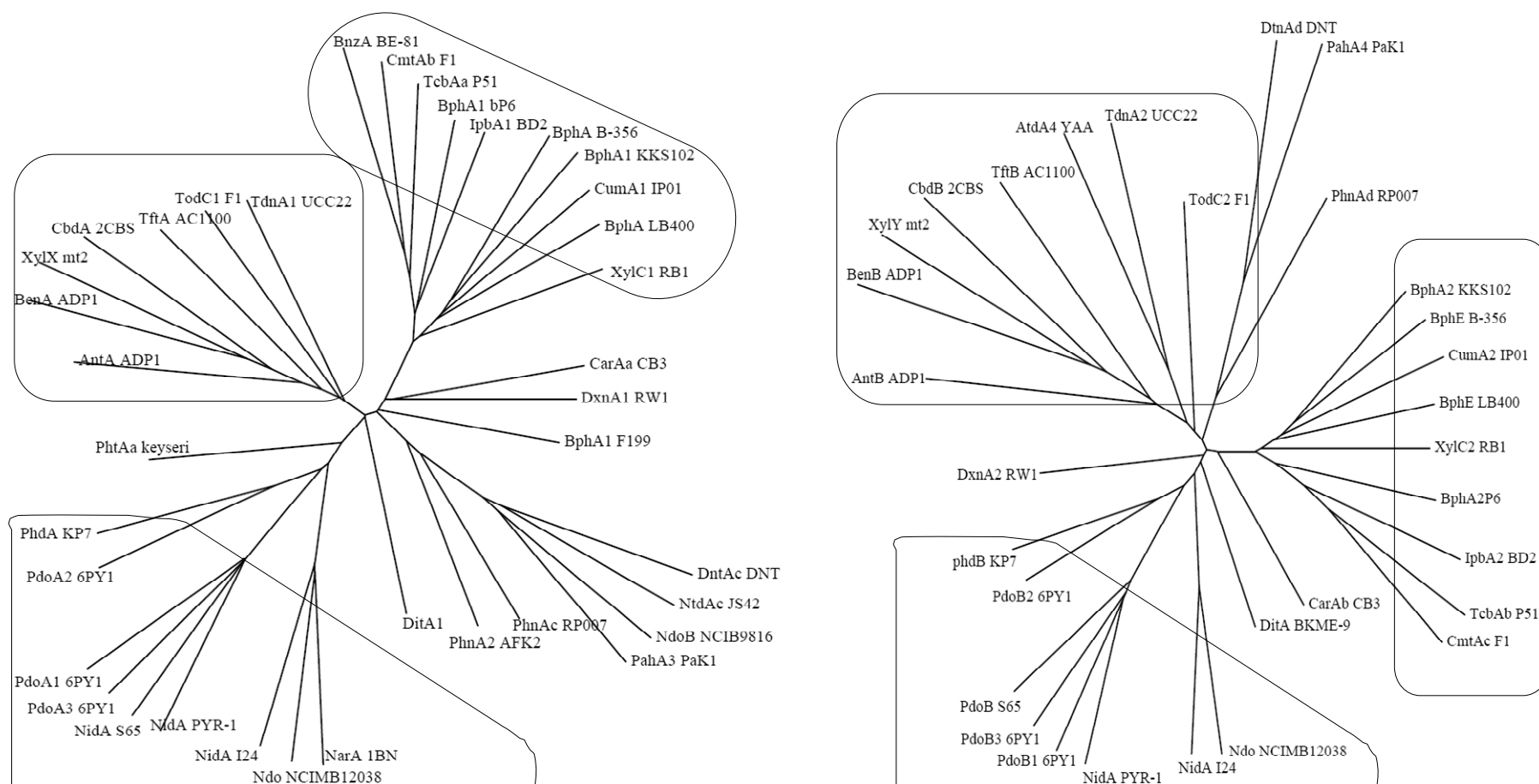
**Tableau 3-4** - Degré de similitude entre les séquences polypeptidiques des sous-unités  $\beta$  des dioxygénases de *Mycobacterium* sp. 6PY1 et celles des dioxygénases les plus proches.

	PdoB1	PdoB2	PdoB3	NidB PYR-1	PhdB KP7
PdoB1	100	62,4	97,6	100	66,7
PdoB2		100	64,2	62,4	79,3
PdoB3			100	97,6	67,2

Il ressort clairement de cette étude phylogénétique que les dioxygénases Pdo1, Pdo2 et Pdo3 font partie d'un sous-groupe de dioxygénases jusqu'ici très peu étudiées, contrairement aux dioxygénases capables d'oxyder le biphényle (Haddock et Gibson, 1995, Hurtubise *et al.*, 1995, Moody *et al.*, 2002, Vaillancourt *et al.*, 2002) et le naphtalène (Ensley *et al.*, 1983, Jones *et al.*, 2003, Larkin *et al.*, 1999, Paraless *et al.*, 2000, Wolfe *et al.*, 2001).

### 3. Transporteurs d'électrons

Les gènes codant pour les ferrédoxines et réductases associées aux dioxygénases de *Mycobacterium* sp. 6PY1 ne se trouvent pas à proximité des gènes de dioxygénases. La ressemblance frappante du locus *pdo2* avec l'opéron *phd* de *Nocardioïdes* sp. KP7 indiquait la présence possible de tels gènes en aval des gènes *pdoA2* et *pdoB2*. Cependant, les similitudes de séquence s'arrêtent après l'ORF1 situé en aval de *pdoB2* et les éléments de séquence obtenus en aval de cet ORF ne correspondent à rien de connu. Les ferrédoxines et réductases associées à Pdo3 ne se trouvent pas non plus à proximité immédiate des gènes codant cette dioxygénase. De même, aucun transporteur d'électrons associé à un homologue de Pdo1 ou Pdo3 n'a été identifié à ce jour dans d'autres souches de *Mycobacterium* (Sho *et al.*, 2004, Stingley *et al.*, 2004).



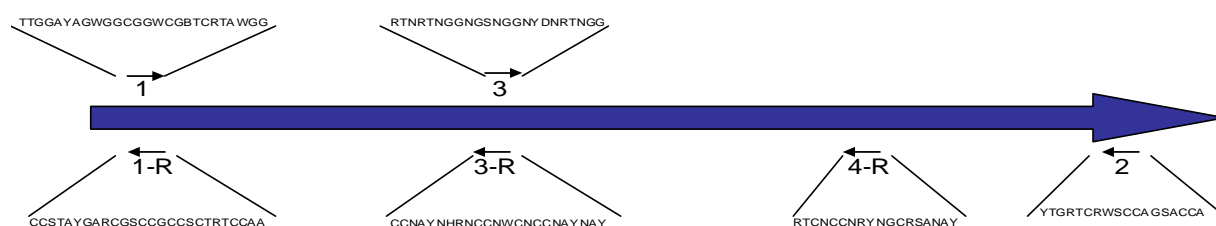
**Figure 3-14** Arbres phylogénétiques montrant les similitudes de séquences en acides aminés entre diverses dioxygénases proches de Pdo1, Pdo2 et Pdo3. A gauche, entre sous-unités  $\alpha$ , à droite entre sous-unités  $\beta$  de dioxygénases. Les séquences ont été récupérées dans les banques de données, au numéro d'accès indiqué entre parenthèses. Sous-unités  $\alpha$  : NidA I24, indène, *Rhodococcus* sp. I24 (AF121905); PhdA KP7, phénanthrène, *Nocardioide* sp. KP7 (AB017794); NarAa NCIMB12038, naphthalène, *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (AF082663); DitA1 BKME-9, diterprenoid, *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 (AF119621); IpbA1 BD2, isopropylbenzene, *Rhodococcus*

*erythropolis* BD2 (U24277); BphA1 P6, byphényle, *Rhodococcus globerulus* P6 (X80041); TcbAa P51, chlorobenzène, *Pseudomonas* sp. P51 (U15298); BnzA BE-81, benzène, *Pseudomonas putida* BE-81 (M17904); TodC1 F1, toluène, *Pseudomonas putida* F1 (J04996); XylC1 RB1, substrat inconnu, *Cycloclasticus oligotrophus* RB1 (U51165); BphA LB400, biphényle, *Burkholderia cepacia* LB400 (M86348); BphA1 KKS102, byphényle, *Pseudomonas* sp. KKS102 (D17319); BphA B-356, biphényle, *Comamonas testosteroni* B-356 (U47637); CumA1 IP01, cumène, *Pseudomonas fluorescens* IP01 (D37828); TdnA1 UCC22, aniline, *Pseudomonas putida* UCC22 (D85415); CmtAb F1, *p*-cumate, *Pseudomonas putida* F1 (U24215); TftA ACC1100, acide 2,4,5-trichlorophenoxyacétique, *Burkholderia cepacia* AC1100 (U11420); AntA ADP1, anthranilate, *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (AF071556); CbdA 2CBS, 2-halobenzoate, *Burkholderia cepacia* 2CBS (X79076); XylX mt2, toluate, *Pseudomonas putida* mt2 (M64747); BenA ADP1, benzoate, *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (AF009224); DxnA1 RW1, dibenzo-*p*-dioxine, *Sphingomonas* sp. RW1 (X72850); CarAa CB3, carbazole, *Sphingomonas* sp. CB3 (AF060489); NdoB NCIB9816, naphthalène, *Pseudomonas putida* NCIB9816 (M23914); PahA3 PaK1, naphthalène, *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 (D84146); NtdAc JS42, 2-nitrotoluène, *Pseudomonas* sp. JS42 (U49504); DntAc DNT, 2,4-dinitrotoluène, *Burkholderia* sp. DNT (U62430); PhnAc RP007, phénanthrène, *Burkholderia* sp. RP007 (AF061751); PhnAc AFK2, phénanthrène, *Alcaligenes faecalis* AFK2 (AB024945); PhtAa, phtalate, *Arthrobacter keyseri* (AF331043); BphA1b F199, biphényle, *Sphingomonas aromaticivorans* F199 (AF079317); NidA PYR-1, pyrène, *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AF249301); NidA S65, pyrène, *Mycobacterium* sp. S65 (AF546904). Sous-unités  $\beta$  : NidB I24 (AF121905); PhdB KP7 (AB017794); BphA2 KKS102 (D17319); DitA BKME-9 (AF119621); NarAb NCIMB12038 (AF082663); CumA2 IP01 (D37828); BphE B-356 (U47637); BphE LB400 (M86348); TodC2 F1 (Y18245); TcbAb P51 (U15298); IbpA2 BD2 (U24277); BphA2 P6 (X8041); XylC2 RB1 (U51165); DxnA2 RW1 (X72850); PhnAd RP007 (AF061751); DntAd DNT (U62430); PahA4 PaK1 (D84146); CarAb CB3 (AF060489); CmtAc F1 (U24215); AntB ADP1 (AF071556); TftB AC1100 (U11420); CbdB 2CBS (X79076); XylY mt2 (M64747); BenB ADP1 (AF009224); AtdA4 YAA (AB008831); TdnA2 UCC22 (D85415); NidB PYR-1 (AF249302); PdoB S65, pyrene, *Mycobacterium* sp. S65 (AF546905).

Plusieurs stratégies ont été mises en œuvre pour identifier les transporteurs d'électrons associés aux dioxygénases de la souche 6PY1. Celles-ci ont consisté à repérer des séquences conservées dans des réductases impliquées dans la dégradation d'hydrocarbures aromatiques, afin d'amplifier par PCR une partie de gène de réductase. Par alignement de sept séquences polypeptidiques de réductases j'ai trouvé quatre courtes zones semi-conservées dont je me suis servi pour concevoir des paires d'oligonucléotides dégénérés (figures 3-15 et 3-16). Le gène *pdoD* codant une aldéhyde déshydrogénase a été cloné de façon fortuite en cherchant à cloner une réductase en utilisant les oligonucléotides REDCONS1-R et REDCONS2. La séquence située en aval

de *pdoB2* a été déterminée grâce à une amplification par PCR mettant en jeu un oligonucléotide censé s'hybrider en 5' d'un gène de réductase (oligonucléotide REDCONS1) alors même qu'aucun gène de réductase n'a été trouvé dans la séquence obtenue.

Nos résultats suggèrent que les dioxygénases de *Mycobacterium* sp. 6PY1 ainsi que les ferrédoxines et réductases associées sont codées par des gènes dispersés. Cet arrangement atypique a déjà été observé dans d'autres bactéries du genre *Sphingomonas* où les gènes de dégradation de xénobiotiques sont dispersés sur le génome (Armengaud *et al.*, 1998, Pinyakong *et al.*, 2003, Romine *et al.*, 1999b). Par exemple, les gènes associés à la dioxine dioxygénase de *Sphingomonas* sp. RW1 codant une ferrédoxine (Armengaud et Timmis, 1997) et une réductase (Armengaud et Timmis, 1998) de *Sphingomonas* sp. RW1 sont éloignés de ceux codant la composante dioxygénase *dxnA1A2* (Armengaud *et al.*, 1998).



**Figure 3-15** - Emplacement et orientation des oligonucléotides dégénérés sur un gène de réductase. Les oligonucléotides REDCONS sont indiqués par leur numéro et leur séquence est indiquée de 5' en 3'.

```

      10      20      30      40      50      60      70
1  ---MRSVAIVGANLAGGRAAEALRQVGFDGRITLIGEEPWRPYERPPPLSKFFLWNPAMSDNFFLQDENWYSDNR
2  ---MRSIAIVGANLAGGRAVEALRQAGFDGRITLIGEEPWRPYERPPPLSKFEVLWDPANVPDNFFLQDEAWYDDNR
3  -----MGSSIGGVRTAQSLRLEGYEGRIVLVGEETELPYDKPPPLSKITVLATGATEASICLLDRDQAQELG-
4  --MTRSVVIVGSSVGGVRTAQALRSQGYDGDVVLVGEETALPYDKPPPLSKALLAGTSDIAAVTLLSRDAAAADA-
5  --DPRTVVVVGASVAGVRTAQSLRTEGFGGRIVLVGDEPDLPYDKPPPLSKQFLAGCWSVERIALLTAEAAAAGV-
6  MTGGQVAALIGGGMAGVHAAEVLRRDGFDRVLLVSAEQHLPYDRPPLSKALLRGELALADCLLRPPEWYEEQG-
7  -MRSADVIVGAGHAGAQAIALRQAGYEGSIALVGRENEVPYERPPPLSKYFYSREKKSFERLYIRPPEFWREKD-

      85      95      105      115      125      135      145
1  IDMLLSTRAEAIDLNAGGVRLSGGQLVAADKVLLATGGHARKLNLAGADCVNVHYLRTRDDAARMALDLRQG-AR
2  IDMRGLTRAEAIDLAGGVRLSGGELVQADRILLATGGHARKLNLAGSNCANVHYLRTRDDATRMALDLREG-AS
3  IELQLGRAATGIDDIAGNLLNLQGQEAHLFDNLVIATGASARPS--PWGQRPGIHVLRITLDDGRSLRADLAKG-GH
4  IELLGRRRAIGVDVAAQVEFADDEPLRYDHLVVATGASARPS--PWGHGSGVHVLRITLEDCLRLRADLVAG-AR
5  IELRLGVAAQRLDVAGRVVLLIDGSTIDYDAAVLATGAAARPA--PWSATSGVHVLRSMADARALRDDLEVD-RP
6  IEVLLGVSDALDPGRRLRLSTGEQVEFDRALLATGARPRWPLGLAPGCGPVFALRTVDDCLAIRSRLRSG-AS
7  IHLTLGIEVSAVDPGSKVLTLSDGSAFAYGQLVWATGGDPRKLACPGAELSGVHAIRTRADCRLMAEIDRGLTQ

      160      170      180      190      200      210      220
1  VVIVGMGVIGIAEVAASAIKLGCEVTAVEPLAGPMERALGKRFGQWLGEHRKRGVKTHTFNRGVTGFKPADGRVSA
2  IVIVGMGVIGIAEVAASAVKLGCKVTVVEPMPVPMERALGRRFGQWLGEHRKRGVATHFNCGVTGFRFSDNRVSA
3  LAVVVGAGFIGIAEAAATARALGLEVTVIDPLPIPMRSIFNAEVGQWFGDLHSSNGVKITFGTGVESIDGEQG-SFA
4  LVVIVGAGFIGIAEVASTARSLGLQVTVDVPPVPMRSVLTTEEIGGWFDLHRDHGVHTRFVGVENIEGERG-NLK
5  VVIVGGGFIGIAEVAATAHALGREVTVDPLSAPIGRVVGREVGELFVDLHTRHGVTTKFGVGVEVEGEAG-DLT
6  VVIVGGGFIGIAELASSAASLGCRVTMLEAADAPFQVRLGRTVGELFGRFYATGGIRLVTVGVQVTGTSVGPGE-GAR
7  VVIVGGGFIGIAEAAAVLTKLNCHVTLLLEAMPRLVARVAGTELSTFYENEHRGHGVDLRTGITVAALEGQES-VTG

      235      245      255      265      275      285      295
1  VEIDDGTVIPCDVAVVVGVIIPATSLAVDAGLTVNNGIIVDRRCQTSN-KAIFAAGDVAEQDG-FFGGRFRQETY
2  VEADDGTVIPCDVAVVVGVIIPATSLARDAGIEVNNGIIVDRRCQTSN-LAVFAAGDVAEQDG-FFGGRFRQETY
3  LRLTNGQNLEAATILVIGI GAVPNDAWLASSGLLVNDGLVLDEYCRTVDAPHIYGVGDVARWRHQKHGEDIRIEHW
4  IGLTDGTVLEADTVVVGIGAVPNDGWLMPSGLVVDDGLVCFDEFCRAVTSQNTIYAVGDSRWFHRRAGVMTMRIEHW
5  VQLTDGSQLAAGTVVVGIGAVPNDGWLAGSGLLVDDGVVCDHECRAVDAADVYAVGDLVLRWFHPGHGEHVRVEHW
6  LTAGDGRFWDADVVVVGVGVPNTLAVDAGLRVSDGVEVDAYCTTSA-PHVFAGDVANRPDPVLGRRVRVIEHW
7  VRLGDGSLPAQAVIVGIGIVPAVAPLIEAGAAGDGGVTVDEYCRTSLPDVFAIGDCASFSCSFADGRVLRVESV

      310      320      330      340      350      360      370
1  QNASDQAQAAASAMLG--HEVDYCKPMWYWSDDFDLNIQFCGQIPAEVVLRGDIESNA---FVALFLSGNTID
2  QNAADQAQAAALAMLG--QEVSYCKPMWYWSDDFDLNIQFCGQIPVEAEVAIRGEMDSNA---FVAFFLAGEAIE
3  TNAVEQAACVAYNITHPTPRAYTPVEYVWSDDHDWKIQVVGVRVGKAEHVVIHGEVHG-RFAALYTVDGTSLS
4  TNAVDQASCVAHNILYPDELRCYEPVEYVWSDDYDWKIQFCGQTHLGEPLVVGDRLSDN-RFTALYDPDREQRSL
5  TNAVESAADVVAHNIAHPEELRSHCPVEYVWSDDYDWKIQVGRPVGATRHTLVGDLTSAHPRGAAYVTDDSGDLR
6  QNAQHQTAAGRAMLG--IREPFDGVPWFWSDDFGLNLQVAGFPDRADRVRVVRGRLEGDR---FAAFYLAGPTLV
7  QNANDQASCVAKTICG--DPQPYRAFPWFWSNQYDLRLQTAGLSLGYDQTVVRGDPAVRS---FSLVLYLKQGRVI

      385      395      405      415
1  GLLTVNRPDMGIGKRLVERRTKASADRLADADVSLRELLMQSAR---
2  GVLTVNRPDMGVGKRLVERRARASAASLADAGMSLRDLLKQAG----
3  GAAIVNWPKALLACRRGMGTGITVQELREKLEPMLDPQPLAAS-----
4  GAAIVNWPRALIECRRALKAGSDLETVRERLELLTNPPDTAATRSP--
5  GAVAVNWPKALLVCRRAVGAGASFDDVVAQLDRLSAAGAAPA-----
6  AALGVGCAGEVHLSRRLIAARAHVDPQRLTDEHSDLRDALLASDVPTA
7  ALDCVMNVKDYVQGRKLVANVCVSPEQLVDTGLALKDLIPV-----

```

**Figure 3-16** Comparaison de séquences de réductases impliquées dans la dégradation d'hydrocarbures aromatiques et identification de séquences conservées ou semi-conservées (encadrées) pour la synthèse d'oligonucléotides dégénérés. Les séquences ayant été comparées sont : 1 - réductase de la naphtalenesulfonate dioxygénase de *Sphingomonas* sp. (AAD45419), 2 - réductase de *Sphingomonas* sp. P2 (BAC65450), 3 - réductase de la phthalate dioxygénase de *Arthrobact keyseri* (AAK16537), 4 - réductase de la phthalate dioxygénase de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (AAQ91919), 5 - réductase de *Terrabacter* sp. DBF63 (BAB5581), 6 - Réductase PhdD de la phenanthrène dioxygénase de *Nocardioïdes* sp. KP7 (BAA94714) et 7 - Réductase RedA2 de la dioxine dioxygénase de *Sphingomonas* sp. RW1 (CAA05635).

## 2. PROPRIETES CATALYTIQUES DE PDO1 ET PDO2

L'analyse des séquences polypeptidiques de Pdo1 et de Pdo2 prédit qu'il s'agit d'arène dioxygénases mais ne renseigne pas sur l'activité catalytique, ni sur leurs substrats préférentiels.

Après avoir mis au point les conditions optimales d'expression en système hétérologue, nous nous sommes intéressés à la gamme de substrats que les dioxygénases sont capables d'oxyder.

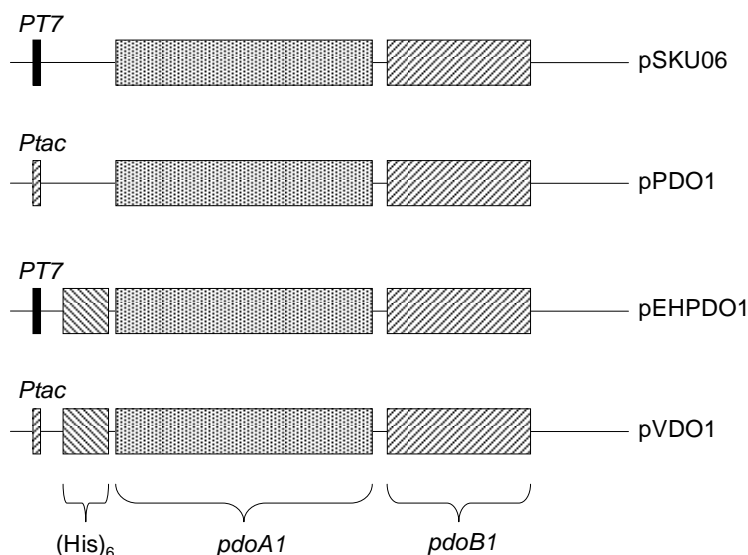
Ce chapitre décrit les tests d'activité qui ont été réalisés *in vivo* sur des cellules recombinantes de *E. coli* surexprimant Pdo1 ou Pdo2. Ces tests ont consisté à incuber ces cellules en présence d'un HAP, puis à extraire le produit d'oxydation avant de le doser par CPG-SM. Plusieurs HAP ont été testés afin d'étudier la sélectivité de ces deux enzymes.

### A. Etude de l'activité de Pdo1

#### 1. Construction de plasmides pour l'expression de Pdo1 dans *E. coli*

Les deux gènes codant les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  constitutives de la dioxygénase Pdo1 ont été clonés dans pET9a entre les sites *NdeI* et *BamHI* (plasmide pSKU06) ainsi que dans pET15b entre les mêmes sites (plasmide pEHPDO1). Ils ont ensuite été sous-clonés dans pVLT31, un vecteur permettant la surexpression chez *E. coli* ou chez *Pseudomonas* donnant les vecteurs pPDO1 et pPVDO1 (figure 3-17). Lors de ces constructions un site de fixation des ribosomes optimal pour l'expression dans les entérobactéries a été introduit en amont de chacun des gènes pour favoriser la synthèse de protéines recombinantes. Deux des vecteurs d'expression (pEHPDO1 et pVDO1) comportaient en outre une séquence en 5' du gène *pdoA1* introduisant une étiquette polyhistidine en position N-terminale de la sous-unité  $\alpha$ .





**Figure 3-17** Vecteurs d'expression utilisés pour surproduire les dioxygénases Pdo1.

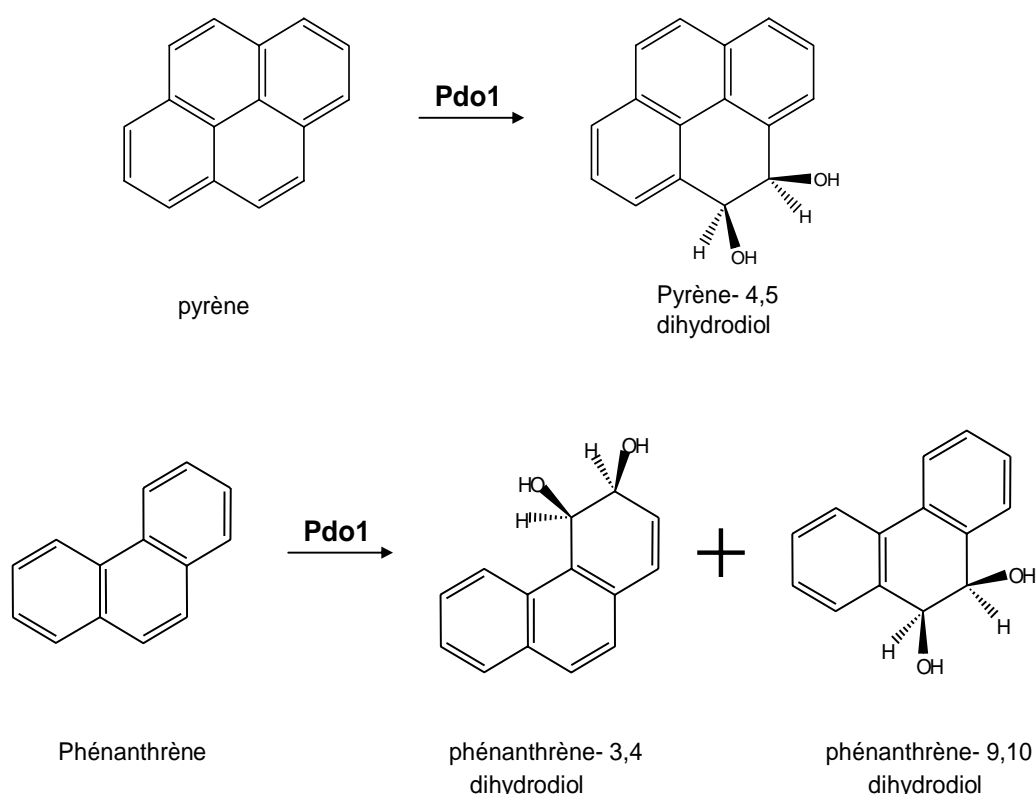
Les plasmides de type pET sont souvent employés pour surproduire des protéines dans *E. coli* car les taux de protéines recombinantes obtenus sont généralement très élevés. Cependant, les enzymes Pdo1 et Pdo2 surproduites par ce moyen se sont révélées peu actives. Ce constat nous a conduit à employer d'autres systèmes d'expression non commerciaux et, d'autre part, à co-exprimer dans *E. coli* des gènes codant des ferrédoxines et des réductases provenant d'autres bactéries.

## 2. Influence de ferrédoxines et réductases hétérologues

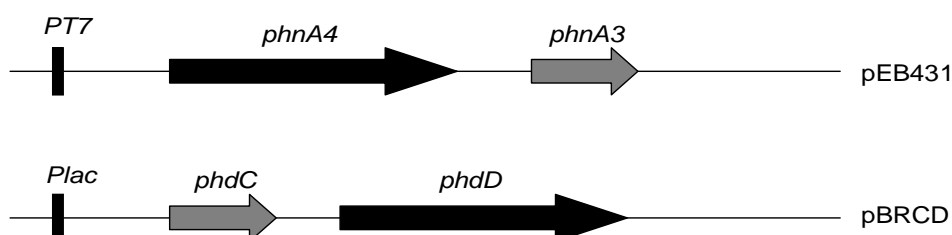
La protéine Pdo1 a tout d'abord été surproduite dans *E. coli* à l'aide du vecteur pSKU06, puis l'activité de l'enzyme a été dosée *in vivo*. Pour cela la souche BL21AI(pSKU06) a été incubée 6h en milieu biphasique contenant du phénanthrène ou du pyrène, les métabolites ont été extraits, dérivés au NBB puis analysés en CPG/SM. Les résultats obtenus montrent une très faible activité de l'enzyme dans ces conditions (Tableau 3-5). L'activité phénanthrène dioxygénase de Pdo1 conduit à la formation de deux dihydrodiols portant les groupes hydroxyles en position 3,4 et 9,10 (figure 3-18). Dans cette expérience, les électrons nécessaires à la réaction de dihydroxylation catalysée par Pdo1 étaient apportés par des transporteurs endogènes de *E. coli*, sans doute inadaptés au fonctionnement de l'enzyme. Les transporteurs d'électrons qui fonctionnent avec Pdo1 dans *Mycobacterium* sp. 6PY1 n'ayant pas été identifiés, nous

avons donc choisi d'associer à Pdo1 la ferrédoxine et la réductase de la phénanthrène dioxygénase de *Nocardioides* sp. KP7. Pour cela, les gènes *phdC* et *phdD* de la souche KP7, portés par le plasmide pBRCD (figure 3-19) ont été co-exprimés dans la souche de *E. coli* contenant le plasmide pSKU06 (figure 3-17). L'incidence de PhdC et PhdD sur l'activité dioxygénase de Pdo1 vis-à-vis du phénanthrène a été étudiée.

Les résultats montrent que PhdC et PhdD n'ont pas augmenté l'activité de Pdo1, le taux d'oxydation du phénanthrène et du pyrène ayant même diminué par rapport à la souche témoin ne surproduisant que Pdo1 (tableau 3-5).



**Figure 3-18-** Dihydroxylation du pyrène et du phénanthrène par Pdo1 : deux produits sont formés à partir du phénanthrène, le 3,4- et le 9,10-phénanthrène dihydrodiol

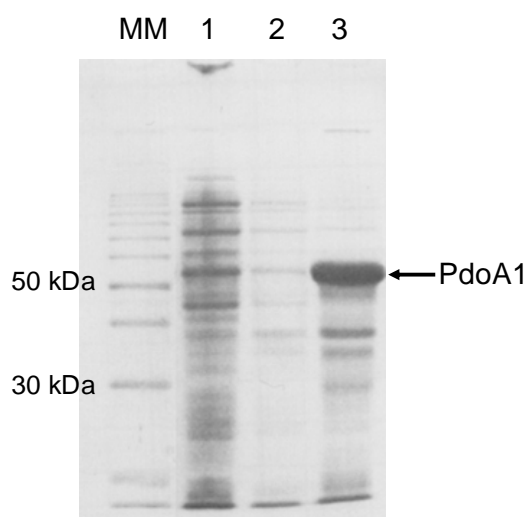


**Figure 3-19–** Vecteurs utilisés pour surproduire les transporteurs d'électrons PhnA3 / PhnA4 et PhdC / PhdD.

**Tableau 3-5** – Activités dioxygénases dans des souches recombinantes de *E. coli* surproduisant la dioxygénase Pdo1 de *Mycobacterium* sp. 6PY1. Les cellules ont été incubées pendant 6h en présence de pyrène ou de phénanthrène. Les quantités de produits ont été mesurées par CPG/SM.

Souche	Produit(s)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -3,4-dihydrodiol (ppm)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -9,10-dihydrodiol (ppm)	Concentration de pyrène <i>cis</i> -4,5-dihydrodiol (ppm)
BL21AI(pSKU06)	Pdo1	0,135	0,317	0,415
BL21AI(pSKU06)(pBRCD)	Pdo1, PhdC et PhdD	0,0875	0,165	0,288

Pdo1 s’est avérée beaucoup plus active lorsqu’elle est exprimée dans *E. coli* DH5 $\alpha$  à l’aide du vecteur pPDO1, dérivé du plasmide d’expression pVLT31 (de Lorenzo *et al.*, 1993) que lorsqu’elle est exprimée dans la souche BL21AI(pSKU06) (Tableau 3-6). L’activité dioxygénase, mesurée par la formation de phénanthrène *cis*-3,4-dihydrodiol, a augmenté d’un facteur 28 par suite du changement de système d’expression. De plus, les proportions relatives des phénanthrène dihydrodiols produits par l’enzyme ont été inversées, le phénanthrène 3,4-dihydrodiol devenant majoritaire.



**Figure 3-20** – Analyse par SDS-PAGE de Pdo1 produite à l’aide du plasmide pSKU06 dans *E. coli* BL21(DE3)(pLysS). Les pistes contiennent les marqueurs de taille (MM), 5  $\mu$ L d’extrait brut préparé par sonication (1), de surnageant (2) ou de culot après centrifugation de l’extrait brut (3).

L’analyse des extraits totaux de *E. coli* par SDS-PAGE montre que les deux systèmes d’expression génèrent une proportion équivalente de polypeptide de 52 kDa, correspondant à la sous-unité  $\alpha$  de Pdo1. Cependant, lorsque Pdo1 est surproduite à

partir du vecteur pET9a, la sous-unité  $\alpha$  de 52 kDa s'accumule en grande majorité sous forme insoluble, probablement sous forme de corps d'inclusion (figure 3-20). La fraction insoluble résulte probablement d'un mauvais repliement de Pdo1 et donc d'une conformation inactive. En revanche, les cellules de *E. coli* surproduisant Pdo1 à partir de pVLT31 synthétisent une enzyme recombinante majoritairement soluble.

Afin d'augmenter l'activité dioxygénase de Pdo1, le plasmide pEB431, un dérivé de pET15b contenant les gènes *phnA3* et *phnA4* codant pour une ferrédoxine et une réductase de *Sphingomonas* sp. CHY-1, a été introduit dans la souche BL21(DE3)(pPDO1). Ces deux protéines sont fonctionnellement associées à une dioxygénase oxydant plusieurs HAP dont le chrysène (Demanèche *et al.*, 2004). La présence de PhnA3 et PhnA4 entraîne une augmentation d'un facteur 2 de l'activité phénanthrène dioxygénase par rapport à la souche témoin (Tableau 3-6). Les protéines PhnA3 et PhnA4 de la souche CHY-1 peuvent donc servir de donneurs d'électrons à l'enzyme Pdo1 pour former un complexe hétérologue fonctionnel.

**Tableau 3-6** Activité de dihydroxylation du phénanthrène par les souches recombinantes de *E. coli* BL21(DE3) surproduisant la dioxygénase Pdo1 de *Mycobacterium* sp. 6PY1. Les cellules ont été incubées pendant 6h en présence de phénanthrène.

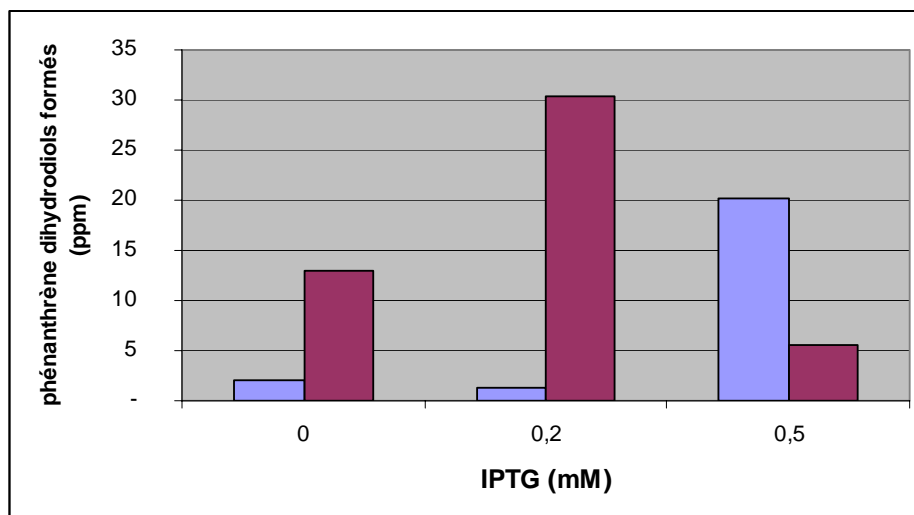
Souche	Produit(s)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -3,4- dihydrodiol (ppm)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -9,10- dihydrodiol (ppm)
BL21(DE3)(pPDO1)	Pdo1	3,822	1,132
BL21(DE3)(pPDO1)(pEB431)	Pdo1, PhnA3 et PhnA4	7,336	2,061

### 3. Effet de la concentration d'inducteur sur l'activité de Pdo1

J'ai étudié l'effet de la concentration d'inducteur sur l'activité de Pdo1 dans des cellules de *E. coli* co-exprimant Pdo1 à l'aide du plasmide pPDO1 et les transporteurs d'électrons PhnA3 et PhnA4 grâce au plasmide pEB431.

Les résultats montrent que l'activité est maximale lorsque Pdo1 est induite par 0,2 mM d'IPTG. En effet, la quantité de produit formé passe de 2,2 ppm de produits formés

par heure (9,10- et 3,4-phénanthrène dihydrodiol) en absence d'IPTG, à 5,1 ppm/h en présence d'IPTG 0,2 mM (figure 3-21). A plus forte concentration, l'activité mesurée était plus faible pour une raison inexpliquée. La quantité d'inducteur retenue pour les tests d'activité *in vivo* est donc de 0,2 mM d'IPTG.

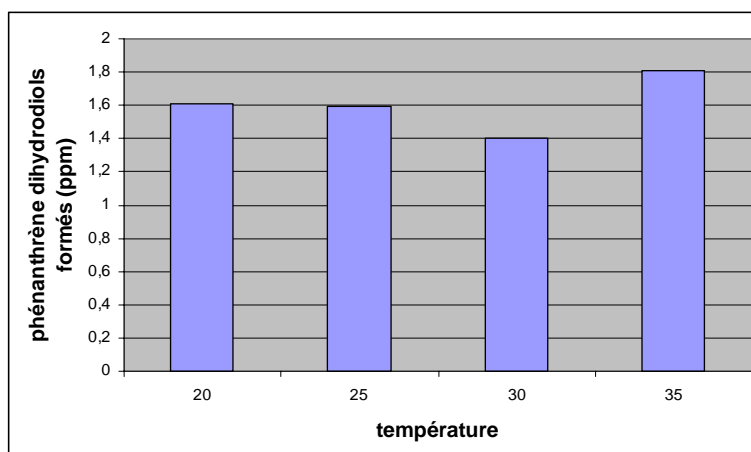


**Figure 3-21** - Phénanthrène dihydrodiol (3,4- et 9,10-) formé par les cellules *E. coli* BL21 (DE3) surexprimant Pdo1 en présence de PhnA3 et PhnA4 (violet) ou en leur absence (bleu).

#### 4. Effets de la température sur l'activité de Pdo1 *in vivo*

Je me suis intéressé à l'influence qu'exerce la température sur l'activité dioxygénase de Pdo1. L'enzyme a été surexprimée à l'aide du plasmide pPDO1, en présence des transporteurs d'électrons hétérologues PhnA3 et PhnA4. Les tests d'activité *in vivo* ont été réalisés à quatre températures : 20, 25, 30 et 35°C.

L'activité phénanthrène dioxygénase a globalement peu varié dans l'intervalle de température étudié (figure 3-22).

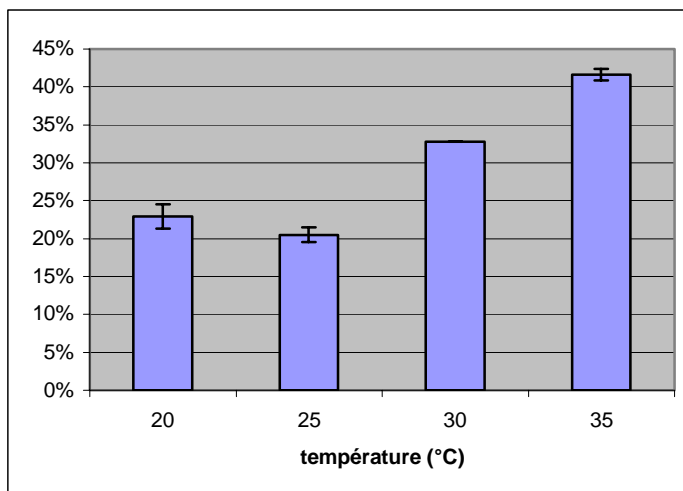


**Figure 3-22** – Effet de la température sur l’activité de Pdo1 sur le phénanthrène. Les concentrations de diols dosés en CPG/SM ont été rapportées au volume de milieu de culture analysé ainsi qu’à la densité optique à 600 nm.

En revanche, la température a une incidence sur la proportion des isomères formés par Pdo1 lors de l’oxydation du phénanthrène. On remarque en effet que plus la température est élevée, plus la proportion de 9,10-phénanthrène dihydrodiol augmente (figure 3-23), tout au moins quand la température dépasse 25°C.

La proportion croissante de 9,10-phénanthrène dihydrodiol en fonction de la température traduit ainsi une activité non optimale de l’enzyme. En effet, celui-ci n’est pas métabolisable et s’accumule dans le milieu lorsque *Mycobacterium* sp. 6PY1 est mise en culture sur phénanthrène (Krivobok *et al.*, 2003), seul l’isomère 3,4- est métabolisé par *Mycobacterium* sp.6PY1.

On peut en conclure que Pdo1 fonctionne de manière optimale à 20 et 25°C dans les conditions dans lesquelles elle a été testée. Le comportement de l’enzyme est assez inhabituel car, contrairement au principe d’Arrhenius, la cinétique de la réaction n’augmente pas en fonction de la température. Dans notre cas, l’enzyme est instable (voir chapitre 3) et a donc tendance à s’inactiver à la chaleur. La cinétique enzymatique étant lente, les dosages se font sur plusieurs heures de sorte qu’il est impossible de distinguer entre la stimulation par l’augmentation de la température et la diminution par inactivation. Pour connaître la température optimale de Pdo1, il faut réaliser des cinétiques plus courtes avec l’enzyme purifiée de manière à s’affranchir des facteurs physiologiques qui peuvent limiter l’activité de l’enzyme *in vivo* (apport d’électrons, de NADH, d’oxygène, de substrat...).



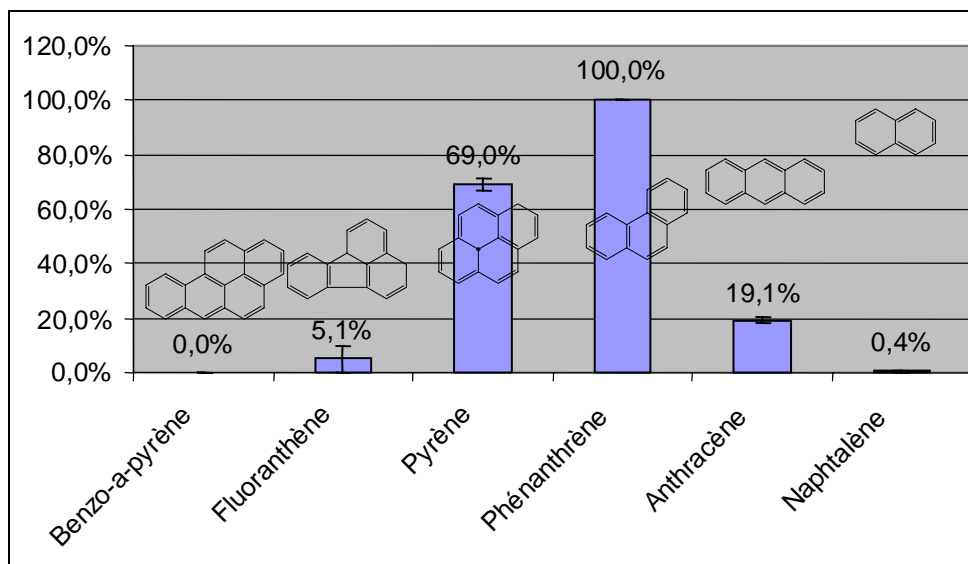
**Figure 3-23** - Effet de la température sur la proportion de 9,10-phénanthrène dihydrodiol généré par Pdo1. La quantité de 9,10-phénanthrène dihydrodiol est calculée en pourcentage de la quantité totale de dihydrodiol produit.

## 5. Sélectivité de Pdo1

Afin de connaître la réactivité de Pdo1 vis-à-vis des HAP de 2 à 5 cycles, j'ai réalisé des tests d'activité *in vivo* en utilisant la souche BL21 (DE3)(pPDO1)(pEB431). Après induction dans les conditions optimales, les bactéries ont été incubées pendant 6h en milieu biphasique avec l'un des 6 HAP étudiés. Les métabolites ont été extraits et analysés par CPG/SM après dérivation au NBB (figure 3-24).

L'enzyme montre une activité maximale vis-à-vis du phénanthrène. Le pyrène est également un bon substrat et dans une moindre mesure l'anthracène et le fluoranthène. Le naphthalène et le benzo[*a*]pyrène ne sont quasiment pas oxydés par Pdo1 dans les conditions testées.

Ainsi l'enzyme Pdo1 possède une nette préférence pour les HAP à 3 ou 4 noyaux aromatiques et une spécificité assez étroite vis-à-vis du substrat



**Figure 3-24** Comparaison de l'activité dioxygénase de Pdo1 vis-à-vis de 6 HAP. Les activités sont exprimées en pourcentage de l'activité maximale observée, correspondant à la conversion du phénanthrène en 3,4-phénanthrène dihydrodiol.

## B. Etude de l'activité de Pdo2

### 1. Construction de plasmides pour l'expression hétérologue de Pdo2

Les gènes *pdoA2B2* ont été amplifiés par PCR en y ajoutant un site *NdeI* en 5' et un site *BglIII* en 3' (couple d'oligonucléotides *pdoA2-F-NdeI* et *pdoB2-R-BglIII*). Ils ont été clonés dans le plasmide pCR4Blunt-TOPO formant la construction pSKU08. Le fragment *NdeI* – *BglIII* contenant les gènes *pdoA2B2* a ensuite été inséré dans pET9a (plasmide pSKU09) et dans pET15b (pEHPDO2). Les gènes *pdoA2B2* ont également été sous-clonés dans le vecteur pVLT31 entre les sites *XbaI* et *HindIII*. Les plasmides obtenus pPDO2 et pVDO2 ont été utilisés pour surproduire la protéine Pdo2 intacte, ou bien une enzyme portant une étiquette polyhistidine fusionnée à la partie N-terminale de la sous-unité  $\alpha$ .



## 2. Influence de ferrédoxines et réductases hétérologues

Le locus *pdo2* présente de fortes homologues avec le locus *phd* de *Nocardioïdes* sp. KP7, tant dans sa séquence que dans son organisation. Cette similitude structurale entre les dioxygénases des deux espèces bactériennes était peut-être corrélée à une similitude fonctionnelle, et, en ce sens, suggérait que les transporteurs d'électrons associés à Pdo2 ressemblaient aux protéines PhdC et PhdD de la dioxygénase de la souche KP7. Nous avons donc co-exprimé dans *E. coli* les gènes *phdC* et *phdD* clonés dans le plasmide pBRCD, avec les gènes *pdoA2B2* clonés dans pSKU09. L'activité dioxygénase de Pdo2 a ensuite été dosée *in vivo* selon le même protocole que celui employé pour doser l'activité de Pdo1.

**Tableau 3-7** – Production de pyrène et phénanthrène dihydrodiol par *E. coli* surproduisant la dioxygénase Pdo2 de *Mycobacterium* sp. 6PY1.

Souche	Produit(s)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -3,4-dihydrodiol (ppm)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -9,10-dihydrodiol (ppm)	Concentration de pyrène <i>cis</i> -4,5-dihydrodiol (ppm)
BL21AI(pSKU09)	Pdo2	0,913	0,00074	0,00893
BL21AI(pSKU09)(pBRCD)	Pdo2, PhdC et PhdD	5,8	0,00164	0,0187

L'activité phénanthrène dioxygénase de Pdo2 a été détectée dans la souche BL21AI(pSKU09), indiquant que des transporteurs d'électrons endogènes de *E. coli* satisfont au moins partiellement les besoins en électrons de la réaction catalysée par Pdo2 (Tableau 3-7).

La co-expression de la ferrédoxine PhdC et de la réductase PhdD de KP7 augmente d'un facteur 6 l'activité de Pdo2 sur le phénanthrène. L'activité de Pdo2 vis-à-vis du pyrène ne progresse pas autant : le rapport des quantités de produits formés en présence et en absence de transporteurs d'électrons hétérologues est de 2. La cinétique d'oxydation du pyrène est cent fois plus lente que celle du phénanthrène.

L'oxydation du phénanthrène par Pdo2 conduit à un rapport des isomères 9,10 / 3,4 de phénanthrène dihydrodiol nettement inférieur à celui trouvé pour Pdo1. La proportion de l'isomère 9,10, non métabolisé par *Mycobacterium* sp. 6PY1, n'atteint pas 1% alors qu'elle était d'environ 20% pour Pdo1.

L'expression de Pdo1 à partir du vecteur dérivé de pVLT31 (pPDO1) ayant permis d'obtenir une meilleure activité, l'activité Pdo2 a été mesurée dans une souche surexprimant Pdo2 à l'aide du plasmide pPDO2 (Tableau 3-8).

**Tableau 3-8** – Activité phénanthrène dioxygénase de *E. coli* surproduisant la dioxygénase Pdo2. (ND : non détecté)

Souche	Produit(s)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -3,4-dihydrodiol (ppm)	Concentration de phénanthrène <i>cis</i> -9,10-dihydrodiol (ppm)
DH5 $\alpha$ (pPDO2)	Pdo2	8,147	ND
DH5 $\alpha$ (pPDO2)(pBRCD)	Pdo2, PhdC et PhdD	6,533	ND

J'ai réalisé des essais préliminaires avec des souches de *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21AI ainsi que *P. putida* KT2442 afin de déterminer la souche bactérienne la plus propice à la surexpression. La souche DH5 $\alpha$  a été choisie car elle a donné les meilleurs rendements en termes d'activité et de polypeptides produits.

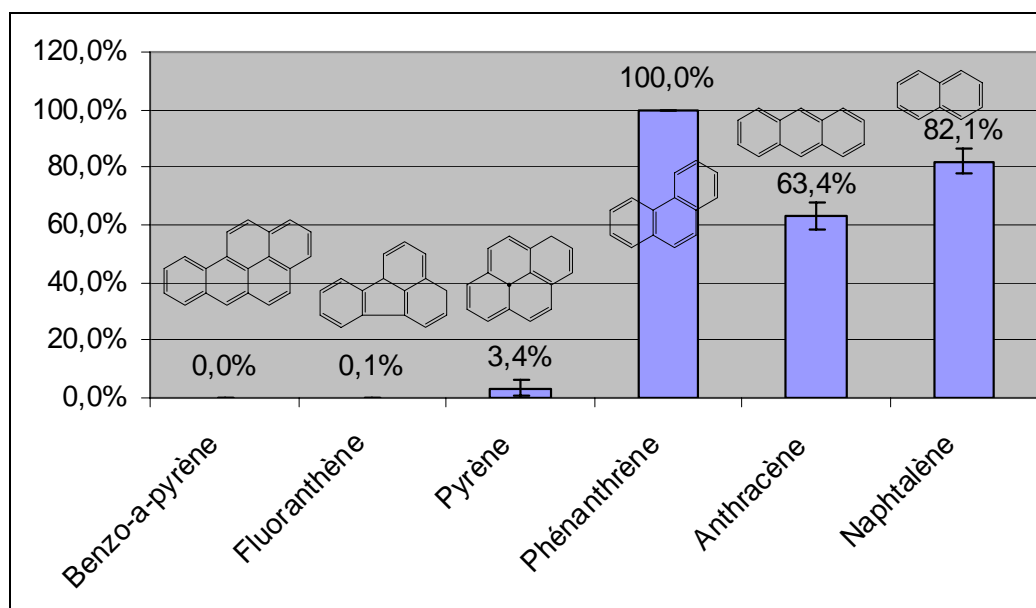
Le dosage de l'activité phénanthrène dioxygénase dans la souche DH5 $\alpha$  (pPDO2) montre une activité en forte progression par rapport à celle mesurée dans la souche BL21AI (pSKU09). L'analyse SDS-PAGE du contenu cellulaire montre que les deux sous-unités de Pdo2 sont produites sous forme soluble (chapitre 3, figure 3-29).

Contrairement au cas précédent, la co-expression de *phdC* et *phdD* avec Pdo2 ne provoque pas d'augmentation de l'activité phénanthrène dioxygénase. La quantité de produit formé est même un peu plus faible que lorsque Pdo2 est surproduite seule. Le plasmide pBRCD n'est pas un plasmide de surexpression, de sorte que les protéines PhdD et PhdC sont produites en quantité relativement faible. Ce résultat suggère aussi que l'enzyme Pdo2 est relativement peu sélective vis-à-vis des protéines de transport d'électrons associées.

Dans la souche BL21AI(pSKU09)(pBRCD), la concentration en Pdo2 active est faible, l'activité catalytique est limitante et ainsi la cinétique d'oxydation du substrat est plus rapide quand l'enzyme est mieux alimentée en électrons par PhdC et PhdD. Par contre dans la souche DH5 $\alpha$ , la concentration en Pdo2 est élevée, l'activité catalytique est faible mais compensée par une forte concentration d'enzyme. La cinétique est limitée soit par l'apport en électrons soit par la vitesse de diffusion du substrat.

## 2. Sélectivité de Pdo2

La réactivité de Pdo2 vis-à-vis de HAP de 2 à 5 cycles a été déterminée *in vivo* en utilisant la souche DH5 $\alpha$  (pPDO2)(pBRCD). J'ai utilisé le même protocole que celui employé pour Pdo1, mais avec une concentration finale d'IPTG de 0,2 mM.



**Figure 3-25** – Comparaison de l'activité dioxygénase de Pdo2 vis-à-vis de 6 HAP. Les activités sont exprimées en pourcentage de l'activité maximale correspondant à la conversion du phénanthrène en 3,4-phénanthrène dihydrodiol.

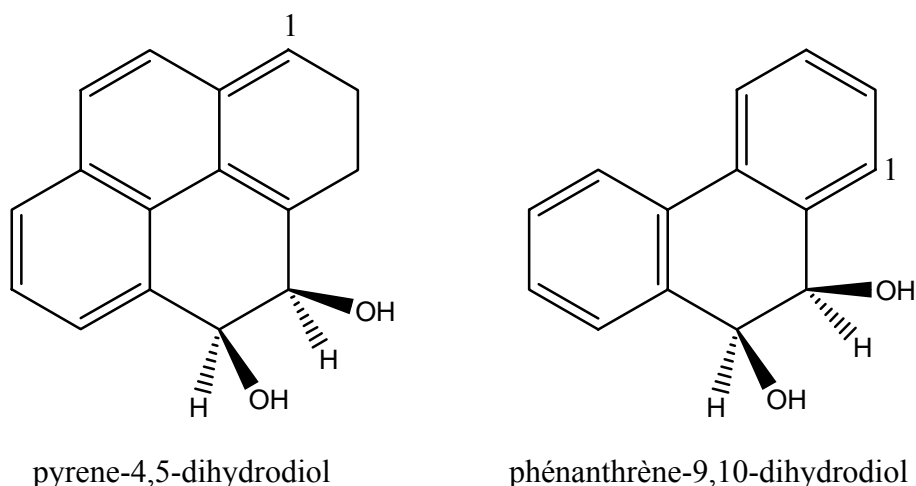
Pdo2 réalise la dihydroxylation du phénanthrène en position 3,4 uniquement. Elle ne produit pas ou très peu d'isomère 9,10 lequel ne peut être métabolisé par la bactérie. L'anthracène et le naphtalène sont également de bons substrats. Dans les conditions des tests, le benzo[a]pyrène, le fluoranthène et le pyrène ne sont quasiment pas hydroxylés par Pdo2 (figure 3-25). Pdo2 montre une préférence pour les HAP à 2 ou 3 noyaux et est quasi-inactive vis-à-vis des HAP de 4 noyaux ou plus. Sa sélectivité est très étroite.

## C. Discussion

Les tests d'activité *in vivo* ont permis de préciser les substrats que Pdo1 et Pdo2 sont capables d'oxyder. Pdo1 catalyse préférentiellement la formation de dihydrodiol à partir de HAP de 3 ou 4 cycles, tels que le pyrène ou le phénanthrène, tandis que Pdo2 oxyde plutôt les HAP dont le nombre de cycles n'excède pas 3 tels que le phénanthrène, le naphthalène ou l'anthracène.

L'oxydation du phénanthrène par Pdo1 amène à la formation de deux produits différents, le 3,4- et le 9,10-phénanthrène dihydrodiol alors que Pdo2 catalyse exclusivement l'hydroxylation du phénanthrène sur les carbones 3 et 4. Ce dernier composé est un intermédiaire dans la voie catabolique du pyrène et du phénanthrène chez *Mycobacterium* sp. 6PY1, alors que le 9,10-diol n'est pas métabolisé. Pdo2 catalyse spécifiquement l'oxydation du phénanthrène alors que Pdo1 réalise la dihydroxylation du pyrène (Krivobok *et al.*, 2003).

Le pyrène et le phénanthrène ne diffèrent l'un de l'autre que par un noyau benzénique. Il était donc plausible qu'une dioxygénase capable d'oxyder le pyrène soit également capable d'oxyder le phénanthrène, et c'est le cas de Pdo1. Lorsqu'on compare la structure du phénanthrène 9,10-dihydrodiol à celle du pyrène 4,5-dihydrodiol, on s'aperçoit que les sites d'hydroxylation (atomes de carbone 4 et 5 du pyrène) correspondent à ceux du 9,10 phénanthrène diol (figure 3-26). Cette observation suggère que le site actif de Pdo1 puisse accueillir le phénanthrène dans deux orientations symétriques. Une partie du phénanthrène serait orientée comme le pyrène au niveau du site catalytique de Pdo1, entraînant la production de 9,10 phénanthrène dihydrodiol, alors que l'autre partie serait orientée de telle sorte que la dihydroxylation ait lieu en C3 et en C4.



**Figure 3-26** – Structures des dihydrodiols produits par Pdo1 selon que le substrat est le pyrène ou le phénanthrène

NidAB, L'homologue de Pdo1 chez *Mycobacterium* sp. PYR-1 présente une activité phénanthrène dioxygénase également, mais un seul produit d'oxydation a été identifié, le phénanthrène 3,4-dihydrodiol. (Stingley *et al.*, 2004). NidAB est également capable d'oxyder le pyrène (Khan *et al.*, 2001).

Pdo2 présente une plus grande activité vis-à-vis du phénanthrène. Cette enzyme possède 79% d'identité de séquence avec la dioxygénase PhdAB de l'opéron de dégradation du phénanthrène de *Nocardioides* sp. KP7 (Tableaux 3-3 et 3-4). Cette dernière dioxygénase a été surproduite chez *E. coli* mais aussi chez *Streptomyces lividans* qui, comme *Mycobacterium*, fait partie des actinomycètes. Dans *S. lividans*, les activités mesurées ont été supérieures puisque 200  $\mu$ M de phénanthrène était pratiquement converti en dihydrodiol en 6h (Chun *et al.*, 2001) alors qu'environ 25% l'était dans notre cas.

Pdo1 et Pdo2 ont besoin d'un apport d'électrons par des protéines de type ferrédoxine et réductase. Ces protéines de la chaîne de transport d'électrons n'ont pas été trouvées chez *Mycobacterium* sp. 6PY1 et les transporteurs d'électrons d'autres espèces bactériennes ont été apportés pour reconstituer des complexes fonctionnels *in vivo*. Néanmoins, les protéines de transport d'électrons apportées dans *E. coli* fonctionnent certainement de façon sub-optimale. Pour déterminer au mieux les caractéristiques des dioxygénases Pdo1 et Pdo2, il devient nécessaire d'identifier les transporteurs d'électrons associés.

### **3. SUREXPRESSION ET PURIFICATION DES COMPOSANTES DIOXYGENASES DE *MYCOBACTERIUM* SP. 6PY1**

Le travail présenté dans ce chapitre concerne la purification des dioxygénases de *Mycobacterium* sp. 6PY1 et la détermination de leurs propriétés moléculaires. Comme les protéines donneuses d'électrons associées aux dioxygénases de *Mycobacterium* sp. 6PY1 n'ont pas été identifiées ni par l'approche protéomique (Krivobok *et al.*, 2003) ni par l'approche génétique (chapitre 1), nous avons choisi d'associer aux composantes dioxygénases purifiées des réductases et ferrédoxines issues d'autres micro-organismes. D'autre part, nous avons mis en œuvre une méthode de détection directe d'activité NAD(P)H oxydoréductase *in vitro* chez *Mycobacterium* sp. 6PY1.

Ce chapitre décrit la surproduction hétérologue et la purification de Pdo1 et de Pdo2, la purification d'une férredoxine, ainsi que les approches utilisées pour doser l'activité des dioxygénases *in vitro*.

#### **A. Surexpression et purification de Pdo1**

##### **1. Surexpression de la dioxygénase Pdo1 et purification de la sous-unité $\alpha$**

La sous-unité  $\alpha$  de Pdo1 (Pdo1 $\alpha$ ) a été surproduite en abondance dans la souche de *E. coli* BL21AI (pSKU06). Seule une petite partie de l'enzyme était active (chapitre 2) et donc correctement repliée. Pdo1 $\alpha$  se retrouvait en majorité sous forme de corps d'inclusion (figure 3-20). Nous avons tiré part du fait que ces corps d'inclusion étaient d'un part faciles à isoler, d'autre part contenaient principalement Pdo1 $\alpha$  pour purifier ce polypeptide en conditions dénaturantes.

L'expression de Pdo1 a été réalisée dans *E. coli* BL21 (DE3) (pLysS) (pSKU06) comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Les cellules ont été lysées par sonication (5 min, amplitude 20%) et l'extrait brut a été centrifugé 10 min à 10 000 x g

afin de séparer les fractions soluble et insoluble. La fraction insoluble, contenant Pdo1, a été solubilisée dans du tampon Tris-HCl 40mM pH8,0 contenant de l'urée 8M puis centrifugée 10 min à 10 000 x g. Cet échantillon a alors été dilué par un volume égal d'eau avant d'être déposé sur une colonne de DEAE-Trisacryl LS (Biosepra SA) de 20 mL équilibrée par une solution de Tris-HCl 20mM pH8,0 contenant de l'urée 4M (Tampon B). L'élution a été réalisée par un gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,5M en tampon B. Les fractions contenant une bande de 52kDa ont été rassemblées puis concentrées par ultrafiltration sur une membrane Amicon dont le seuil de coupure était à 30 kDa. La protéine a ensuite été purifiée par électrophorèse sur un gel préparatif de polyacrylamide en présence de SDS, puis extraite du gel par électro-élution (Electroeluter model 422 ; Bio-Rad SA). Cette préparation purifiée a été utilisée pour immuniser un lapin et lui faire produire des anticorps polyclonaux dirigés contre la sous-unité  $\alpha$  de Pdo1.

## 2. Isolement de Pdo1 sous forme soluble

Pdo1 a été surproduite dans les cellules *E. coli* BL21AI (pBRCD)(pSKU06). L'induction a été faite en deux temps : tout d'abord induction de l'expression des gènes *phdCD* codant pour la ferrédoxine et la réductase PhdC et PhdD pendant 2h à 30°C par de l'IPTG 0,5 mM; ensuite induction de l'expression des gènes *pdoA1B1* par du D/L-arabinose à 0,2% (p/v). Cette induction en deux temps a eu pour résultat d'augmenter la proportion de Pdo1 sous forme soluble.

La purification de Pdo1 est réalisée en anaérobiose avec des tampons préalablement dégazés sous argon, la protéine étant instable en présence d'oxygène. Après avoir été centrifugées et lavées en Tris-HCl 25mM pH7,5, les cellules sont traitées au lysozyme (0,25 mg/mL) dans du tampon TEG (Tris-HCl 20 mM pH7,5, Ethanol 5%, Glycérol 5%) pendant 30 min à 37°C avant d'être lysées par sonication (5 min, 20% d'amplitude). L'extrait brut est alors centrifugé pendant 10 min à 10 000 x g. Le surnageant, contenant la fraction soluble, est alors dilué par un volume de tampon TEG avant d'être déposé sur une colonne de DEAE-Cellulose (DE52, Whatman) équilibrée en tampon TEG. La protéine Pdo1 forme une bande brune qui est décrochée de la colonne en tampon TEG + NaCl 0,5 M. La fraction est ajustée à une concentration de 1 M en sulfate d'ammonium, puis centrifugée 10 min à 10 000 x g, le précipité, de couleur

brunâtre, est repris en tampon TEG afin d'être dialysé pendant une nuit à 4°C contre 1 L de tampon TEG.

Le dialysat est déposé sur une colonne FPLC échangeuse d'anions de type Q-HyperD (Biosepra SA) équilibrée en tampon TEG. Les protéines sont éluées par un gradient de 0 à 0,5 M de NaCl en tampon TEG. En concentration insuffisante, la protéine d'intérêt n'a pu être détectée par son absorption caractéristique à 460 nm. Les fractions contenant Pdo1 ont été repérées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), puis rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon de 30 kDa de seuil de coupure, et enfin congelées dans de l'azote liquide. A en juger par l'analyse SDS-PAGE, la protéine est assez homogène (figure 3-27). Le dosage BCA des protéines permet d'évaluer la concentration de Pdo1 à environ 4,5 mg/mL.

Il semble qu'une partie de la fraction protéique de départ ait été perdue lors de la dialyse, ceci est très certainement dû à son instabilité.

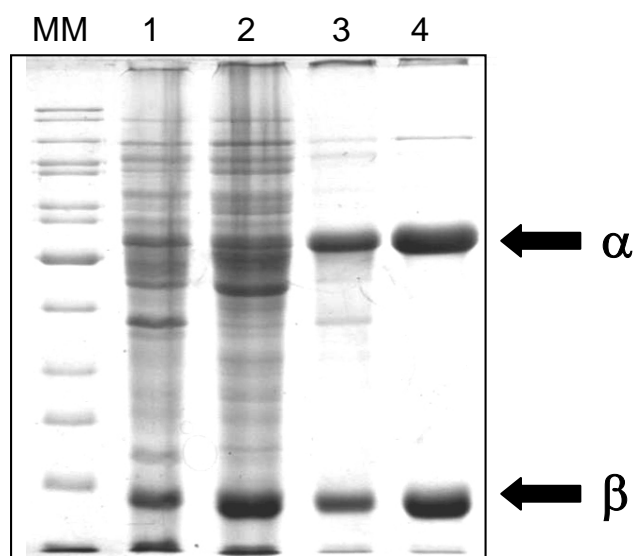
### **3. Caractérisation de Pdo1**

L'analyse par SDS-PAGE de la fraction purifiée de Pdo1 montre que la protéine est constituée de 2 polypeptides dont les masses apparentes sont de 19 kDa et 52 kDa. Ces estimations sont en accord avec les valeurs prédites d'après les séquences polypeptidiques qui étaient de 19,5 kDa et 50,5 kDa respectivement.

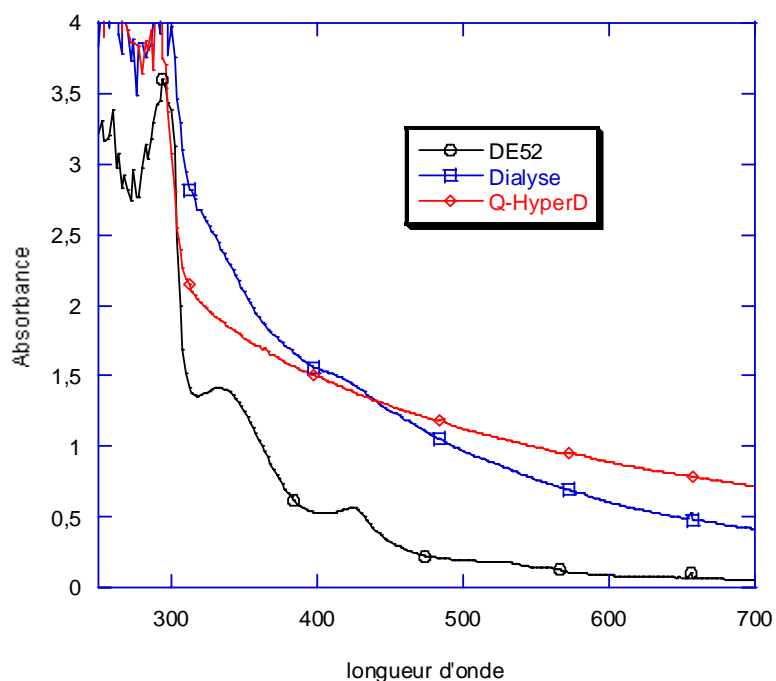
### **4. Spectre UV-visible**

Le spectre UV-visible de Pdo1 a été suivi au cours de la purification, après chaque étape (figure 3-28). La fraction issue de la colonne DE-52 montre des maxima d'absorbance à 330 et 460 nm, caractéristiques des dioxygénases. Ces maxima indiquent la présence de centres [2Fe-2S] de type Rieske. Cependant, à ce stade de la purification, une protéine contaminante de *E. coli* ayant un maximum d'absorption vers 420 nm se superpose à l'absorption de Pdo1. Les spectres réalisés sur la protéine après dialyse et en sortie de colonne Q-HyperD ne présentent pas ces maxima indiquant que la protéine s'est certainement dénaturée lors de la dialyse. La protéine s'est décolorée pendant cette étape, confirmant qu'elle a probablement perdu ses centres fer-soufre.





**Figure 3-27** : Analyse par SDS-PAGE des fractions de purification de Pdo1. MM : Marqueurs de masse moléculaire (10 kDa ladder). 1 : surnageant de l'extrait bactérien. 2 : fraction éluée de la colonne échangeuse d'anions DE-52. 3 : fraction précipitée au sulfate d'ammonium. 4 : fraction éluée de la colonne échangeuse d'anions Q-HyperD. Dépôts de 10  $\mu$ L dans la piste 1 et de 5  $\mu$ L dans les pistes 2, 3 et 4. Les flèches indiquent les deux polypeptides majoritaires de masses moléculaires apparentes de 52000 ( $\alpha$ ) et 19000 ( $\beta$ ).



**Figure 3-28** - Spectres d'absorptions UV-visible des fractions de purification de Pdo1 sur colonne DE52, après dialyse et après Q-HyperD.

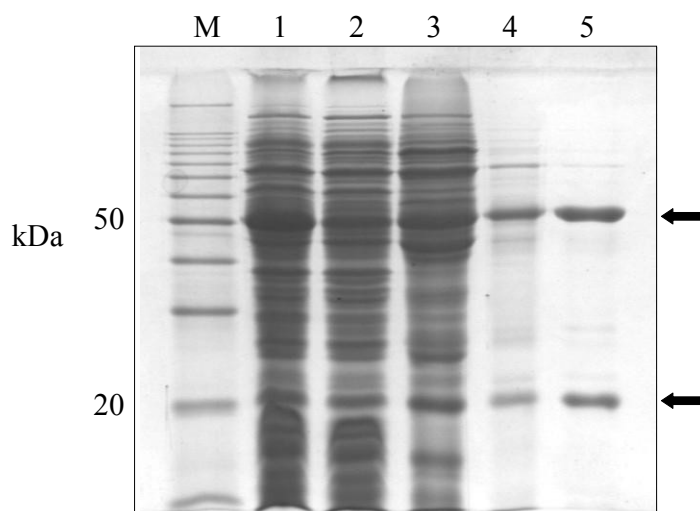
## **B. Surexpression et purification de Pdo2**

La surproduction de Pdo2 a d'abord été effectuée avec la souche BL21(DE3)(pLysS)(pSKUO9) car c'était le premier système d'expression disponible. Bien que non optimal, ce système a surproduit une dioxygénase active *in vivo* (chap. 2).

### **1. Isolement de Pdo2**

Les meilleures conditions de surexpression de Pdo2 ont été déterminées. Les cellules sont induites à  $DO_{600} \sim 0,6$ , par de l'IPTG à 0,1 mM, à 25°C pendant 3h.

La purification de Pdo2 a été réalisée à partir d'une culture en fermenteur de 12L. Les premières étapes de la purification sont les mêmes que pour la purification de Pdo1. Après avoir été ajustée à 1M de sulfate d'ammonium, la fraction est centrifugée 20 min à 10 000 x *g*. Le surnageant, de couleur brune, est déposé sur une colonne de 20 mL d'interaction hydrophobe de type phényl-Sepharose (Amersham Biosciences) équilibrée en tampon TEG contenant du sulfate d'ammonium 1 M. L'élution est réalisée par un gradient de sulfate d'ammonium de 1 à 0 M dans du tampon TEG, la protéine est suivie par son absorbance à 280 et 416 nm. La fraction recueillie est mise en dialyse contre 1 L de tampon TEG pendant une nuit à 4°C. Après concentration sur membrane Amicon par ultrafiltration, la fraction protéique est déposée sur une colonne FPLC de type Q-HyperD (Biosepra SA) équilibrée en tampon TEG. L'élution se fait par un gradient de NaCl de 0 à 0,5 M. Les fractions recueillies sont analysées par SDS-PAGE et les plus pures sont rassemblées. La concentration est estimée par dosage des protéines par la méthode BCA à 8,4 mg/mL, soit 12,6 mg au total. Le rendement de purification est donc de 1 mg par litre de culture. Une partie de l'échantillon (2 mg) est utilisée pour la synthèse d'anticorps polyclonaux de lapin, le reste étant congelé dans l'azote liquide.



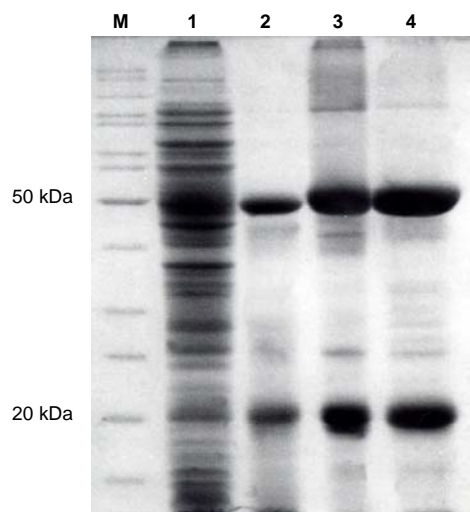
**Figure 3-29** : Analyse par SDS-PAGE des fractions de purification de Pdo2. MM : Marqueur de masse moléculaire. 1 : Extrait brut. 2 : surnageant de l'extrait bactérien. 3 : fraction éluée de la colonne échangeuse d'anions DE52. 4 : fraction éluée de la colonne d'interaction hydrophobe Phényl-Sepharose. 5 : fraction éluée de la colonne échangeuse d'anions Q-HyperD. Les dépôts sont de 10  $\mu$ L pour les pistes 1 et 2, et de 5  $\mu$ L pour les pistes 3, 4 et 5. Les flèches marquent les polypeptides majoritaires de masse moléculaire apparente de 20 et 50 kDa.

## 2. Isolement de His<sub>6</sub>-Pdo2

Les résultats de mesure de l'activité de Pdo2 vis-à-vis du phénanthrène ont montré une activité beaucoup plus forte lorsque la protéine était surproduite grâce au plasmide pPDO2 que lorsqu'elle l'était avec pSKU09 (chapitre 2). Pour la purifier, nous avons donc décidé de surproduire la dioxygénase à partir du même vecteur, en y incorporant une étiquette polyhistidine en partie N-terminale. Pour cela, les gènes *pdoA2B2* de la dioxygénase ont été clonés dans le vecteur pET15b, formant le plasmide pEHPDO2, dont ils ont été sortis avec la séquence codant la queue polyhistidine pour être introduits dans pVLT31, formant le plasmide pVDO2.

La souche *E. coli* DH5 $\alpha$  contenant le plasmide pVDO2 a été mise en culture en fermenteur de 12 L. A une DO<sub>600</sub>~1 les cellules ont été induites par 0,2 mM d'IPTG pendant 20h à 30°C. Les premières étapes de purification ont été réalisées selon le même protocole que celui utilisé pour purifier Pdo1. Après dépôt de l'extrait cellulaire sur la colonne DE-52, celle-ci est lavée par du tampon TEG puis par du tampon TEG

contenant 0,1 M de NaCl. Ce dernier lavage permet l'élimination d'un contaminant jaune dont l'absorbance interfère avec celle de la dioxygénase.



**Figure 3-30**– Analyse par SDS-PAGE des fractions de purification de His<sub>6</sub>-Pdo2. M : Marqueurs de masse moléculaire (10 kDa ladder). 1 : fraction éluée de la colonne échangeuse d'anions DE-52. 2 : fraction éluée de la colonne d'affinité TALON. 3 : fraction éluée de la deuxième colonne échangeuse d'anions DE-52. 4 : fraction d'élution de la colonne échangeuse d'anions Q-HyperD. Dépôts de 10 µL dans la piste 1 et de 5 µL dans les pistes 2, 3 et 4. Les deux polypeptides majoritaires présentent des masses moléculaires apparentes de 50000 et 20000 Da.

La bande brune correspondant à la dioxygénase est éluée par du tampon TEG contenant 0,5 M de NaCl. L'éluat coloré est chargé sur une colone de type TALON de 8 mL préalablement équilibrée en tampon TEG contenant 0,5 M de NaCl. Après lavage par ce tampon puis par le même tampon contenant 20 mM d'imidazole, la colonne est éluée par du tampon TEG contenant 150 mM d'imidazole. L'éluat est dilué par 5 volumes de tampon TEG puis déposé sur une colonne de 5 mL de DE52. Pdo2 est éluée en tampon TEG contenant 0,5 M de NaCl. A ce stade de la purification, la protéine est suffisamment pure pour étudier ses paramètres cinétiques et enzymatiques *in vitro*.

Afin d'éliminer les contaminants résiduels, un tiers de l'échantillon est dilué dans 10 volumes de tampon TEG puis déposé sur une colonne de type Q-HyperD. L'élution est réalisée par un gradient de NaCl de 0 à 0,5 M en tampon TEG. Les fractions recueillies sont analysées par SDS-PAGE et les fractions les plus pures sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration sur membrane Amicon de 30 kDa de seuil de coupure.

Les concentrations ont été estimées par dosage des protéines (tableau 3-9).

**Tableau 3-9** Tableau de purification de His<sub>6</sub>-Pdo2. La quantité de Pdo2 a été estimée selon l'absorbance des échantillons à 456 nm. \* la présence d'un contaminant d'*E. coli* fausse la valeur estimée.

Etape de purification	Prot. totale (mg)	PDO2 (mg)	Rend. (%)
DE52	750	453*	-
TALON	61	60	100
DE52 #2	56	23	38
Q-HyperD	61	45	75

Quarante-cinq mg de Pdo2 ont été obtenus à l'issu de cette purification ce qui correspond à un rendement de 3,75 mg de protéine purifiée par litre de culture. La quantité de Pdo2 obtenue en sortie de DE52 #1 est surestimée car l'analyse SDS-PAGE montre qu'il y a moins de 60% de Pdo2 dans l'éluat de la colonne (figure 3-30).

### 3. Masse moléculaire et structure quaternaire de Pdo2

L'analyse SDS-PAGE des fractions de purification de Pdo2 indique que la protéine est composée de 2 polypeptides de masses apparentes de 20 et 50 kDa environ. Tout comme pour Pdo1 ces valeurs sont proches des valeurs attendues.

La taille approximative de la dioxygénase sous forme native a été estimée à environ 200 kDa sur colonne de gel filtration SD200. Cette valeur est en accord avec la conformation en hétérohexamère de type  $\alpha_3\beta_3$  (masse calculée : 216 kDa) et comparable avec les valeurs rapportées pour d'autres dioxygénases (Ensley et Gibson, 1983) (Haddock et Gibson, 1995).

### 4. Spectre d'absorption UV-visible de Pdo2

La protéine a été suivie tout au long de la purification par spectrophotométrie UV-visible (figure 3-33). Les spectres obtenus sont caractéristiques des protéines à centres fer-soufre avec la présence de trois maxima. Les maxima sont décalés selon que la protéine se trouve sous forme réduite ou sous forme oxydée. Lorsque la protéine est

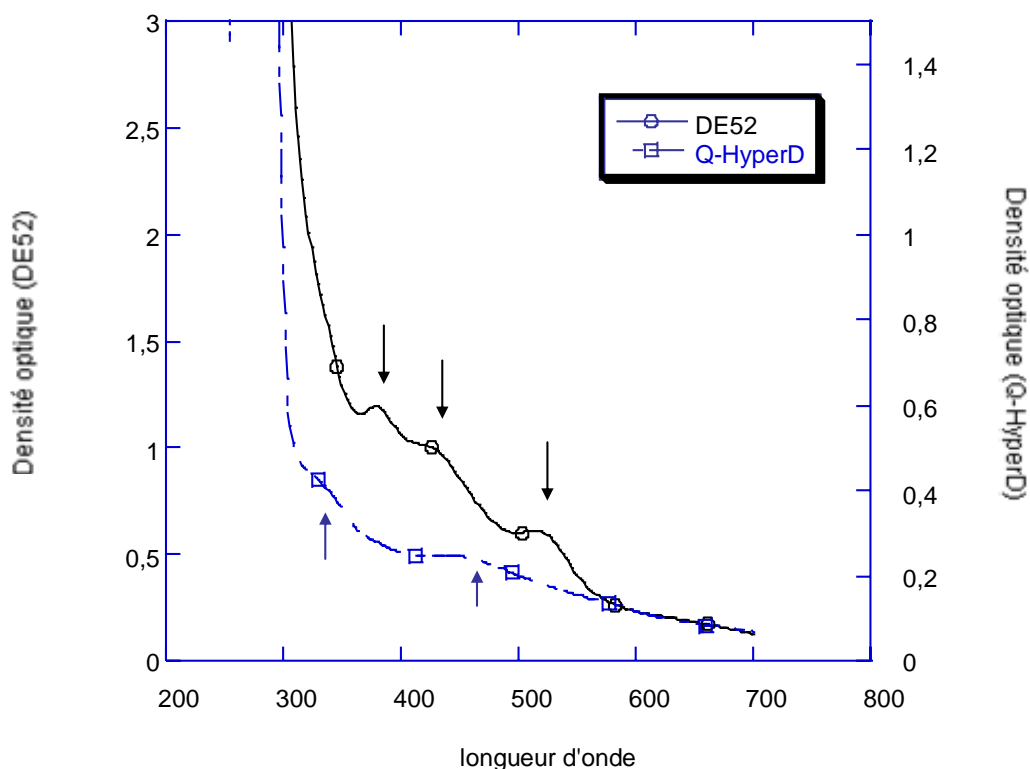
réduite, les trois maxima d'absorption se situent à 380, 430 et 520 nm, tel que cela peut-être observé sur le spectre d'absorption de Pdo2 en sortie de DE52 puisque la purification est réalisée sous argon (figure 3-31). Lorsque la protéine est oxydée, certainement en raison de la présence de traces d'oxygène, les trois maxima d'absorption se trouvent décalés présentant alors des valeurs d'environ 320, 460 et 580 nm. La protéine sous sa forme purifiée doit donc se trouver dans un état partiellement réduit alors qu'en sortie de colonne DE-52 elle était à l'état réduit.

La détermination de la concentration en protéine de la fraction purifiée a permis de calculer la valeur du coefficient d'extinction molaire de Pdo2, soit  $10,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  à 456nm.

La comparaison des deux procédures d'isolement de la dioxygénase Pdo2 fait apparaître que la pureté ne varie pas beaucoup selon la méthode de purification utilisée. En effet, les analyses SDS-PAGE montrent la présence de polypeptides contaminants en quantité équivalente dans les deux cas. Par contre, la deuxième procédure de purification basée sur l'utilisation d'un système d'expression plus performant et produisant une protéine portant une étiquette polyhistidine a donné un meilleur rendement. Alors que 1 mg de dioxygénase par litre de culture était obtenu par le premier protocole, on a obtenu 3,75 mg de cette même protéine par litre de culture par la deuxième procédure de purification. De plus, l'ensemble de la purification est réalisable en une vingtaine d'heures dans le deuxième cas contre environ deux jours pour le premier.

### **C. Essai de purification de réductases de *Mycobacterium* sp. 6PY1**

N'ayant pu identifier un gène codant pour une réductase, nous avons cherché à identifier directement une réductase de *Mycobacterium* sp. 6PY1 à partir de cultures de celle-ci. La méthode employée a consisté à comparer les réductases présentes dans des extraits de bactéries cultivées en présence de trois substrats : l'acétate, le benzoate et le phénanthrène. Les profils d'induction des dioxygénases Pdo1 et Pdo2 n'étant pas différents sur pyrène et sur phénanthrène (Krivobok *et al.*, 2003), nous avons supposé que les réductases associées aux dioxygénases Pdo1 et Pdo2 étaient induites sur le phénanthrène comme sur le pyrène.



**Figure 3-31** - Spectre d'absorption UV-visible de la fraction purifiée de His<sub>6</sub>-Pdo2. Les flèches marquent les maxima d'absorption à 378, 428 et 514 nm en sortie de DE52 (noir) et à 318 et 472 nm en sortie de Q-HyperD (bleu). Les spectres ont été enregistrés dans une cuvette de 1 cm de chemin optique.

Des extraits cellulaires de *Mycobacterium* ont été préparés en anaérobie en lysant les bactéries en tampon Tris-HCl 75 mM pH8,0, EDTA 10 mM glycérol 10% par sonication (3 min, 25% d'amplitude) après avoir fragilisé les cellules par un traitement de 30 min à 37°C en présence de lysozyme (2,5 mg / mL). Après centrifugation (60 min, 10 000 x g, 4°C), le surnageant de chaque lysat a été déposé sur colonne de DEAE-cellulose (DE52, Whatman). Après lavage en tampon TEG, l'élution a été réalisée en tampon TEG contenant 0,5 M de NaCl. Un échantillon de chaque éluat a été analysé par électrophorèse sur gel natif à 0,8% d'acrylamide. Le gel a été incubé pendant 60 min dans un bain contenant du réactif NBT. Les protéines possédant une activité NBT réductase sont révélées dans le gel par une bande bleue résultant de la réduction du colorant (Tableau 3-10).

**Tableau 3-10**– Mise en évidence d’activités NBT réductases dans les extraits de *Mycobacterium* sp. 6PY1. Les activités observées pour l’extrait sur phénanthrène étant très faibles, certaines bandes n’ont pas pu être détectées (ND), ce qui ne signifie pas que les réductases sont absentes. Le  $R_f$  représente le rapport de la distance de migration de la bande sur la distance du front de migration.

Bande	$R_f$	Présente sur		
		Acétate	Benzoate	Phénanthrène
1	0,8	+	+	+
2	1,2	+	+	+
3	1,4	-	+	ND
4	1,5	+	-	+
5	1,65	-	+	ND
6	2,05	-	+	ND
7	2,4	-	+	ND

Alors que seulement 3 protéines présentaient une activité NBT réductase sur acétate, d’autres protéines ont apparemment été induites en présence de benzoate ou de phénanthrène à des niveaux semblables à en juger par l’intensité des bandes observée sur le gel d’électrophorèse.

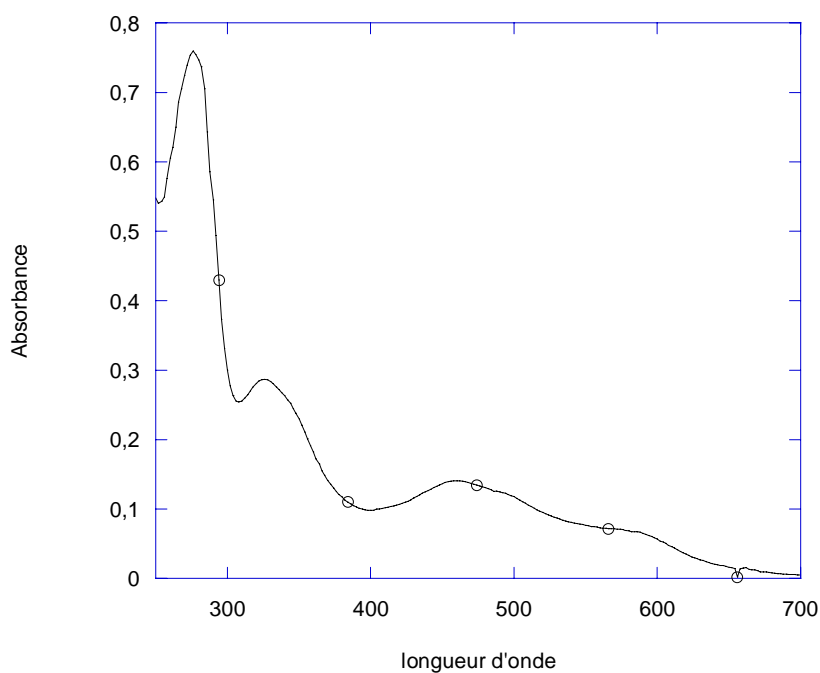
#### **D. Purification de la composante ferrédoxine BphA3 de *Pseudomonas* sp. B4**

N’ayant pu identifier aucune ferrédoxine associée aux dioxygénases Pdo de *Mycobacterium* sp. 6PY1, nous avons choisi d’utiliser une ferrédoxine provenant de la bactérie *Pseudomonas* sp. B4, impliquée dans l’oxydation du biphenyle (Rodarie et Jouanneau, 2001).

La purification de la protéine a été réalisée sous argon selon une procédure déjà décrite (Rodarie et Jouanneau, 2001). Brièvement, après avoir été induites pour la surproduction de BphA3, les cellules, cultivées dans un volume de 2,4 L, ont été lysées par sonication puis l’extrait cellulaire a été chargé sur colonne DEAE-Cellulose (DE52, Whatman). L’élution de la protéine repérée par sa couleur brune s’est faite en présence de tampon contenant 0,25 M de NaCl. Une deuxième colonne DE52 a permis de concentrer l’échantillon qui a ensuite pu être chargé sur une colonne de gel filtration de type Aca54 (Ø2,6 cm x 110 cm). A ce stade de la purification, la protéine était pure à en



juger par l'analyse SDS-PAGE. Son spectre d'absorption UV-visible montre des maxima d'absorbance à 330 et 460 nm caractéristiques de la présence d'un centre [2Fe-2S] de type Rieske (figure 3-32).



**Figure 3-32** – Spectre UV-visible de la ferredoxine BphA3 après passage sur colonne Aca54

### E. Dosage de l'activité de Pdo2 *in vitro*

Possédant, au laboratoire, des souches de surexpression de ferredoxines et réductases, nous avons testé si un système hybride composé de la réductase BphG de *Comamonas testosteroni* B-356 (Hurtubise *et al.*, 1995), de la ferredoxine BphA3 de *Pseudomonas* sp. B4 (Rodarie et Jouanneau, 2001) et de Pdo2 était capable d'oxyder le NADH *in vitro*. Pour cela, j'ai mélangé les 3 composantes et j'ai suivi l'oxydation du NADH par spectrophotométrie à 340 nm en utilisant le phénanthrène comme substrat de Pdo2. Pour déterminer la consommation de NADH uniquement due à la dioxygénase, un témoin a été réalisé qui contenait l'ensemble des constituants du mélange excepté le

phénanthrène. Cet échantillon a permis d'obtenir la valeur d'auto-oxydation du NADH (tableau 3-11).

Les valeurs d'oxydation du NADH obtenues sont plutôt faibles, montrant certainement que le complexe hybride formé n'est pas très fonctionnel. En effet, des valeurs 10 à 20 fois supérieure ont pu être obtenues au laboratoire avec la biphényle dioxygénase de *Pseudomonas* sp. B4 (Rodarie et Jouanneau, 2001). L'oxydation du NADH en absence de la dioxygénase était supérieure à celle que l'on pouvait observer lorsque la dioxygénase était rajoutée dans le mélange réactionnel.

**Tableau 3-11** – Cinétiques d'oxydation du NADH mesurées par dosage spectrophotométrique pour Pdo2.

	Auto-oxydation	$t_0$	$t_{15}$
Vitesse d'oxydation (nmol/min/mg Pdo2)	2,2	-	6,4

## F. Discussion

La surexpression hétérologue chez *E. coli* s'est révélée efficace afin de surproduire les dioxygénases Pdo1 et Pdo2 de *Mycobacterium* sp. 6PY1.

Pdo1 a été la plus difficile des deux à surproduire. Dans un premier temps, elle avait été clonée dans pET9a et introduite dans la souche de surexpression *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Comme cela a été décrit dans le deuxième chapitre des résultats, Pdo1 était alors surproduite pratiquement uniquement sous forme de corps d'inclusion. La surproduction de la protéine a été optimisée en jouant sur les paramètres d'induction, la température, la concentration d'inducteur, la densité bactérienne. Malgré l'optimisation des conditions, la protéine n'a pas été obtenue en quantité suffisante pour déterminer ses propriétés moléculaires et catalytiques. Nous avons alors décidé de changer de souche de surexpression. Le plasmide pSKU06 a été introduit dans *E. coli* BL21AI, une souche dans laquelle l'induction se fait par de l'arabinose. Cette stratégie s'est révélée efficace. Le spectre UV-visible de la protéine, caractéristique des enzymes de type de dioxygénase, ressemble à des spectres publiés pour la naphtalène dioxygénase (Ensley et Gibson, 1983) ou la biphényle dioxygénase (Haddock et Gibson, 1995). Néanmoins Pdo1 est instable, notamment en présence d'oxygène.

La surproduction et la purification de Pdo2 ont été plus aisées car cette protéine s'est avérée plus stable. Une première purification a été réalisée à partir de la souche *E. coli* BL21(DE3)(pLysS)(pSKU09) a donné un rendement de 1 mg de protéine par litre de culture. La deuxième procédure de purification de Pdo2 présentée a été réalisée dans *E. coli* DH5 $\alpha$  portant le plasmide pVDO2. Le rendement en protéine purifiée a été de 3,75 mg par litre de culture. C'est avec cette souche que les analyses SDS-PAGE ont montré la plus grosse surproduction de Pdo2. La structure quaternaire de la protéine a pu être déterminée par tamis moléculaire, comme étant de type  $\alpha\beta_3$ . Comme Pdo1, le spectre UV-visible de Pdo2 présente les caractéristiques des spectres de dioxygénases.

La très grande similitude dans les séquences polypeptidiques des deux dioxygénases Pdo1 et Pdo3 ainsi que la grande proximité que ces protéines ont par leur taille expliquerait que Pdo3 n'ait été identifiée sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle. Sur ces gels, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  identifiées comme correspondant à Pdo1 formaient plusieurs spots bien distincts de même masse mais dont les points isoélectriques variaient. Il est possible que deux de ces spots correspondent aux sous-unités constitutives de la dioxygénase Pdo3, leur identification sur gel devrait être facilitée en ajoutant de la protéine Pdo3 à l'extrait protéique déposé. Dans la séquence récemment publiée dans GenBank par l'équipe de Cerniglia (Stingley *et al.*, 2004), *nidB* et *nidB2* codent pour deux sous-unités  $\beta$  très proches l'une de l'autre (un seul acide aminé diffère entre les deux). Par contre, aucune sous-unité  $\alpha$  n'est détectée à proximité de *nidB2*.

L'analyse des séquences polypeptidiques de Pdo1 et Pdo2 ainsi que des spectres obtenus indiquent la présence de centre [2Fe-2S] de type Rieske dans ces deux dioxygénases. Ce type de centre fer-soufre est coordonné par deux cystéines et deux histidines (Rieske *et al.*, 1967). L'analyse des séquences en acides aminés révèle également la présence des résidus conservés au sein des dioxygénases, impliqués dans la liaison du fer mononucléaire du site actif. Ainsi le motif conservé Glu-X<sub>3-4</sub>-Asp-X<sub>2</sub>-His-X<sub>4-5</sub>-His est retrouvé dans les trois séquences de sous-unités  $\alpha$  identifiées chez *Mycobacterium* sp. 6PY1. La structure tridimensionnelle de la naphthalène dioxygénase de *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 a montré que le résidu Asp<sub>362</sub> de cette enzyme était également impliqué dans la coordination du fer au centre actif (Kauppi *et al.*, 1998). Ce résidu est également conservé dans les dioxygénases Pdo. Enfin, l'Asp<sub>205</sub> de la naphthalène dioxygénase a été décrit comme assurant le transfert des électrons entre

centre [2Fe-2S] d'une sous-unité  $\alpha$  et fer mononucléaire de la sous-unité  $\alpha$  adjacente (Parales *et al.*, 1999).

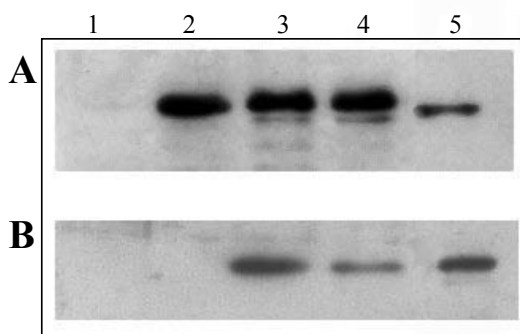
Il reste primordial d'identifier les protéines de transport des électrons associées aux dioxygénases Pdo1 et Pdo3. Une stratégie consiste à purifier les protéines présentant une activité réductase, que j'ai commencé. La purification des protéines présentant une activité réductase est suivie en utilisant le NBT comme indicateur. Après une première étape d'élimination d'un grand nombre de protéines par passage sur une colonne échangeuse d'anions, les réductases devraient être purifiées par passage sur une colonne de type Cibacron blue. Ce type de colonne retient les protéines ayant le NAD(P) pour cofacteur, ce qui est le cas des réductases. Les réductases spécifiquement induites sur phénanthrène, en prenant une culture sur acétate comme référence, seraient alors identifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non-dénaturantes suivie d'une coloration au NBT. Le séquençage N-terminal et interne des protéines montrant une activité réductase devrait alors permettre d'obtenir les éléments de séquence nécessaires à la synthèse d'oligonucléotides pour amplifier par PCR les gènes les codant.



#### 4. ANALYSE DE L'INDUCTION DES DIOXYGENASES DANS *MYCOBACTERIUM* SP. 6PY1 PAR IMMUNODETECTION.

Nous nous sommes intéressé à l'induction spécifique des dioxygénases Pdo1 et Pdo2 dans la souche 6PY1 en fonction du substrat de croissance de celle-ci.

Lorsque *Mycobacterium* sp. 6PY1 était cultivée sur acétate, aucune activité de minéralisation du pyrène n'était détectée. Cette activité présentait un niveau intermédiaire lorsque la bactérie était cultivée sur benzoate et un niveau maximal sur pyrène ou phénanthrène. L'expression des dioxygénases Pdo1 et Pdo2 chez *Mycobacterium* sp. 6PY1 en fonction du substrat de croissance a donc été étudiée. La bactérie a été mise en culture en présence d'acétate (témoin), de benzoate, de phénanthrène et de pyrène. Des extraits protéiques ont alors été préparés (*Matériel et méthodes*, 3.F), puis séparés sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les dioxygénases ont été repérées par immunodétection en utilisant les anticorps polyclonaux anti-Pdo1 et anti-Pdo2 de lapin (figure 3-35).



**Figure 3-35 :** Analyse par SDS-PAGE et immunodétection de l'expression de Pdo1 et Pdo2 chez *Mycobacterium* sp. 6PY1. La souche 6PY1 a été cultivée avec de l'acétate (1), du benzoate (2), du phénanthrène (3) ou du pyrène (4). Deux gels ont été chargés avec des quantités semblables d'extraits protéiques puis analysés par immunodétection de type Western en utilisant les anticorps anti-Pdo1 (A) et anti-Pdo2 (B). Les pistes 5 ont été chargées avec 0,4 µg de Pdo1 (A) ou Pdo2 (B).

L'analyse montre que Pdo1 est synthétisée en présence de composés aromatiques, et indétectable lorsque la souche croît en présence d'acétate. De plus, une autre bande moins intense qui migre au même niveau que Pdo2 est détectée dans les extraits

protéiques de *Mycobacterium* sp. 6PY1 cultivée sur phénanthrène ou sur pyrène. Cette bande correspond effectivement à la sous-unité  $\alpha$  de Pdo2, car il a été montré au laboratoire que les anticorps anti-Pdo1 donnaient lieu à une réaction croisée avec cette protéine. L'analyse des extraits protéiques avec les anticorps anti-Pdo2 montre une expression de cette protéine seulement lorsque la bactérie est cultivée en présence de HAP.

Ces résultats confortent et précisent ceux obtenus par électrophorèse bidimensionnelle. Ils montrent une induction de Pdo1 par un hydrocarbure monoaromatique et par les HAP alors que Pdo2 n'est induite que par des HAP.

Les analyses de la sélectivité vis-à-vis des HAP montrent que Pdo1 est capable d'oxyder des composés aromatiques à 3 cycles ou plus. Or, l'expression de l'enzyme est activée même en présence de composés simples comme le benzoate. Ces résultats posent la question du mécanisme de régulation qui contrôle l'expression de Pdo1. Le fait que la protéine soit exprimée en présence de pyrène, de phénanthrène et de benzoate suggère qu'un métabolite commun aux voies cataboliques de ces trois composés soit le véritable effecteur déclenchant la synthèse de l'enzyme.

Pdo2 est induite par le pyrène et le phénanthrène mais n'est pas capable d'oxyder de HAP de 4 cycles comme le pyrène. Dans ce cas, il se peut que la synthèse de Pdo2 soit régulée par un autre métabolite commun aux voies de dégradation du phénanthrène et du pyrène.

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**





## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

### 1. CONCLUSIONS

Au cours de ce travail de thèse, trois nouvelles arène dioxygénases ont été découvertes chez *Mycobacterium* sp. 6PY1. Nous avons montré que deux d'entre elles sont directement impliquées dans l'oxydation initiale des HAP.

#### A. Existence de multiples gènes d'arène dioxygénases chez *Mycobacterium*

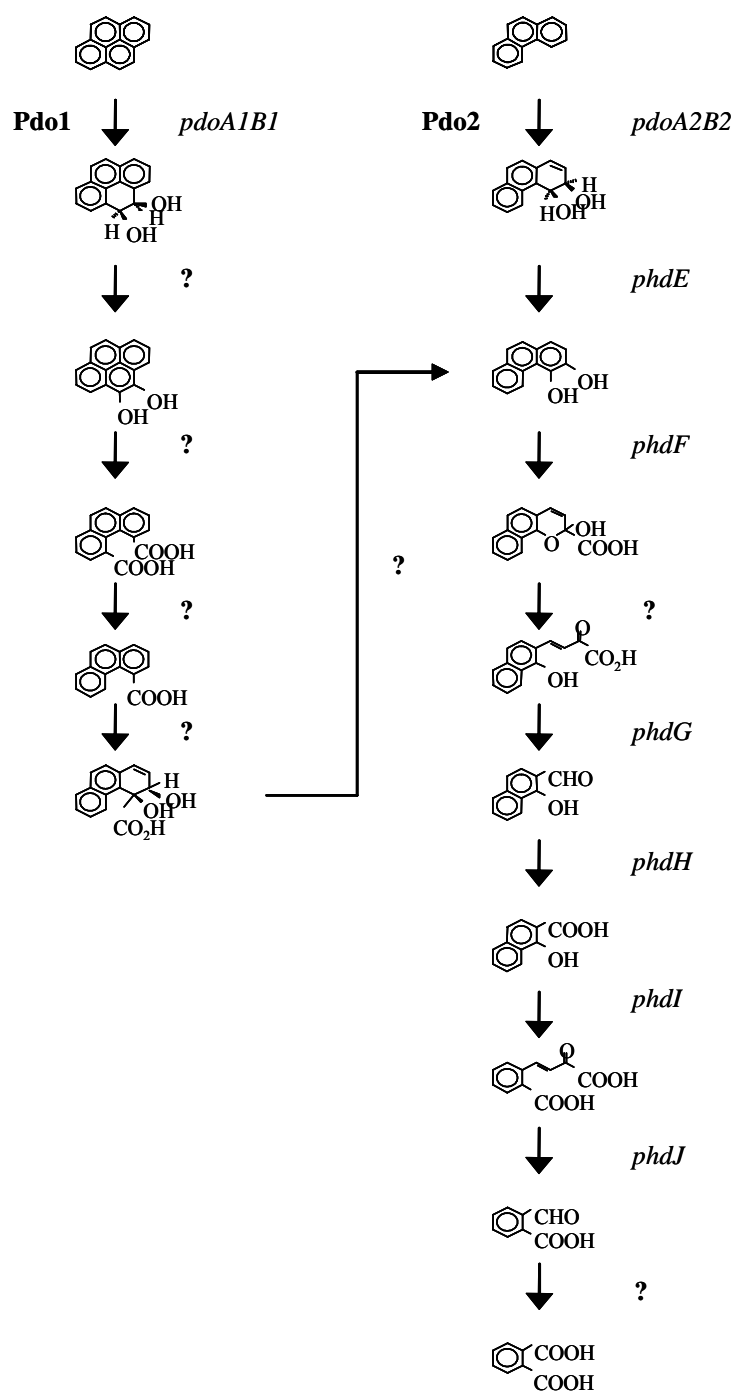
Les gènes *pdoA1B1* codant pour Pdo1 présentent une ressemblance étonnante avec les gènes *pdoA3B3*, découverts plus récemment dans le génome de 6PY1, ce qui suggère qu'il s'agit de deux copies issues d'une duplication. Dans deux autres souches de *Mycobacterium*, des résultats récents ont montré l'existence des gènes quasi identiques (Khan *et al.*, 2001, Sho *et al.*, 2004, Stingley *et al.*, 2004). Qui plus est, dans la souche *Mycobacterium* sp. S65, on retrouve deux copies d'un locus contenant outre des gènes homologues de *pdoA1B1*, un gène *pdoC* homologue de *pdoC* présent dans le locus *pdo3* de 6PY1, et deux autres gènes très semblables. L'un des deux loci est précédé par un gène de transposase, indiquant qu'une transposition est peut-être à l'origine de la duplication (Sho *et al.*, 2004). Dans la souche PYR-1, une seule copie des gènes *nidAB* homologues de *pdoA1B1/A3B3* a pour l'instant été détectée, mais le locus qui les contient est flanqué de gènes de transposases (Stingley *et al.*, 2004). Il existe de nombreux cas semblables de gènes cataboliques situés sur des éléments mobiles notamment chez les bactéries qui dégradent les xénobiotiques, et cette mobilité est l'un des mécanismes d'adaptation génétique des bactéries (van der Meer *et al.*, 1992).

Cependant, les trois cas évoqués sont singulièrement ressemblant surtout si l'on considère l'éloignement et la différence d'origine des souches considérées. Il reste à savoir si le fait de posséder plusieurs copies des gènes codant ce type de dioxygénase confère aux bactéries hôtes un avantage pour ce qui est du métabolisme des HAP et du pyrène en particulier.

Un autre locus contenant les gènes de structure d'une enzyme de type phénanthrène dioxygénase a été découvert dans le génome de 6PY1. Le locus *pdo2* présente une similarité tant dans sa séquence que dans son organisation avec les gènes de dégradation du phénanthrène chez *Nocardioides* sp. KP7 (Saito *et al.*, 2000). Les gènes *pdoA2B2* sont associés au gène *pdoF* codant pour une extradiol dioxygénase. Cette enzyme clive le noyau aromatique en position *meta* de diols aromatiques et catalyse donc certainement la troisième étape de la dégradation du phénanthrène (Fig. 4.1). Chez *Nocardioides* KP7, le locus correspondant contient en outre les gènes *phdE*, *phdG* et *phdH* qui codent respectivement pour les enzymes des étapes 2, 4 et 5 de la voie du phénanthrène, et les gènes *phdC* et *phdD* qui codent pour la ferrédoxine et la réductase associées à la phénanthrène dioxygénase. Chez 6PY1, toutes les protéines correspondantes ont été repérées par l'approche protéomique sauf des homologues de PhdC et PhdD (Krivobok *et al.*, 2003). Les gènes sont apparemment organisés différemment puisqu'on ne retrouve pas les gènes homologues de *phdG*, *phdH*, *phdC* et *phdD* à proximité de *pdoA2B2*. Dans la souche *Mycobacterium* PYR-1, seulement deux de ces gènes (*phdF* et *phdG*) ont été identifiés dans un cluster de 37 kb contenant un grand nombre de gènes cataboliques (Stingley *et al.*, 2004).

## **B. Voies cataboliques du pyrène et du phénanthrène**

Comme il vient d'être discuté, la plupart des gènes ou des protéines responsables de la voie de dégradation du phénanthrène ont été mis en évidence chez *Mycobacterium* 6PY1 soit par l'approche protéomique soit par l'approche génétique. Nos résultats consolident le schéma de la voie de dégradation que nous et d'autres auteurs avons proposé sur la base de travaux antérieurs (figure 4-1). Les étapes 1, 2 et 3 sont catalysées par Pdo2, une déshydrogénase (PhdE) homologue de celle décrite chez *Nocardioides* KP7 et le produit du gène *phdF* trouvé dans le locus *pdo2*. Les enzymes catalysant les étapes 5, 6, 7 et 8, une hydratase-aldolase (PhdG), une aldéhyde déshydrogénase (PhdH), une autre aldolase (PhdJ) et une 1-hydroxy 2-naphtoate dioxygénase (PhdI) ont été repérées par électrophorèse bidimensionnelle (Krivobok *et al.*, 2003). L'étape 4 est catalysée par une isomérase qui n'a pas encore été identifiée ni par électrophorèse bidimensionnelle ni par le séquençage des gènes cataboliques chez *Mycobacterium* sp. PYR-1 ou sp. S65 (Sho *et al.*, 2004, Stingley *et al.*, 2004).



**Figure 4-1** - Voie de dégradation du pyrène et du phénanthrène chez les bactéries du genre *Mycobacterium*

L'enzyme produisant l'acide phtalique à partir du 2-carboxybenzaldéhyde est une déshydrogénase codée par *phdK* chez *Nocardioïdes* KP7 (Iwabuchi et Harayama, 1998, Saito *et al.*, 2000). Aucune enzyme similaire n'a été identifiée chez *Mycobacterium*,

mais le produit du gène *pdoD* (ou *nidD* chez PYR-1) codant pour une aldéhyde deshydrogénase pourrait catalyser la réaction.

A part Pdo1 qui catalyse l'attaque initiale du pyrène, on ne connaît pas les enzymes impliquées dans les premières étapes du métabolisme qui conduisent au 3,4-dihydroxyphénanthrène (figure 4-1). Le produit du gène *pdoC* (ou *nidC*) qui est adjacent aux gènes de structure de Pdo1, a une parenté structurale avec des deshydrogénases à courte chaîne, et de cette observation, il a été proposé que la protéine PdoC catalyse l'étape 2 (Sho *et al.*, 2004). Cependant, la similitude de séquence avec les enzymes de type dihydrodiol deshydrogénase bien caractérisée comme BphB (Hulsmeyer *et al.*, 1998) est très limitée et donc la fonction de PdoC reste à démontrer. Les étapes suivantes sont un clivage du noyau aromatique par une intradiol dioxygénase, puis deux décarboxylations et enfin une dioxygénation. Les enzymes impliquées pourraient figurer parmi les protéines spécifiquement induites par le pyrène repérées sur gel 2D, et qui n'ont pas encore été identifiées (Krivobok *et al.*, 2003).

### C. Propriétés et sélectivité des dioxygénases Pdo1 et Pdo2

Les protéines Pdo1 et Pdo2 ont été purifiées sous forme recombinante. La protéine Pdo1 s'est révélée trop instable pour être isolée dans une conformation active. Pdo2 a été purifiée sous la forme d'un hétérohexamère  $\alpha_3\beta_3$  dont les propriétés sont comparables aux enzymes de ce type déjà caractérisées. Notamment, son spectre d'absorption est semblable à ceux d'autres dioxygénases (Ensley et Gibson, 1983, Haddock et Gibson, 1995).

La comparaison des séquences des sous-unités  $\alpha$  des dioxygénase Pdo1 et Pdo2 avec celle de la naphtalène dioxygénase de *Pseudomonas* sp. NCIB9816-4 montre que les résidus ligands du centre fer-soufre de type Rieske ainsi que ceux qui lient l'ion ferreux du site actif sont conservés (Figure 4-2). Lorsqu'on compare les acides aminés de la poche hydrophobe qui reçoit le substrat dans NdoB (Carredano *et al.*, 2000), on remarque que 41% de ces résidus seulement sont conservés chez Pdo1 et 53% chez Pdo2. La similitude de séquence est encore plus réduite (<20%) au niveau de deux boucles qui bordent l'accès au site actif et pourraient influencer la sélectivité (Figure 4-2). Ceci est en accord avec l'hétérogénéité observée dans les séquences à ce niveau

(Yeates *et al.*, 2000). On remarque que les séquences de Pdo1 et Pdo2 correspondant aux deux boucles qui bordent le site actif sont identiques à 71% et 46%.

PdoA1	MQTETTTTGTADATDPYLRRALREVADGLKVGRLPARVVSDPALHTIEMERIFGRAWVF
PdoA2	-----MSTVGKNDIQQLVAAGREGLAKGRLPAGLVANAELHKLEAQRVFGRCWQF
NdoB	-----MNYNNKILVSESGLSQKHLIH---GDEELFQHELKTI FARNWLF
PdoA1	LGHESELAQSGDFVVRHIGADSVIVCRDNSGRIQALSNSCRHRGALVCRAEMGNTAHFQC
PdoA2	LAHETETIPQAGDYVVRYLGGGSIIVVRGEDGEVRAMANSCHRRGTMLCRTEMGNTSHFRC
NdoB	LTHDSLIPAPGDYVTAKMGIDEVIVSRQNDGSIRAFNLNVCRRHRGKTLVSVEAGNAKGFVC
PdoA1	PYHGWVYSNTGELVGVPAAMSEAYPGGFDKSQWGLRHIPHVDSYAGYIFGSVDPKAPSLTD
PdoA2	PYHGWYRNTGTLAGVPAQKEYVGVEMDKNEWSLTQVPRLENYRGMIFGCLDEKAEPVLD
NdoB	SYHGWGFGSNGELQSVPFKEDLYGESLNKKCLGLKEVARVESFHGFIYGCDFQEAPPLMD
PdoA1	YLGDTTFYLDLIAKKTAGGLEVIGAPHLWVMSANWKAADNFVGDSTHTLFAHRSMVELG
PdoA2	YLGDMAYLDTITQKSKGGLEVRGEPQRWIDSNWKLADNFVGDAYHTLMTHRSAVELG
NdoB	YLGDAAWYLEPMFKHS--GGLELVGPPGKVVIKANWKAPAENFVGDAYHV*GWTHASSLSRG
PdoA1	MAPDPNSASAPAEISLQNGHGVGVLPPTTAPFPEYEGPDEVVDQMATSYPSPVHKD
PdoA2	LAPDPKFASEPAHISLSNGHGLGVLPVTP--GCMPPFMNTPPEVVDGLAAAYGDQDRAD
NdoB	ESIS-SLAGNAALPPEGAGLQMTSKYSGSMGVWDGYSGHSADLVPELMAFGGAKQER
PdoA1	LMRRSAFIHGTVPNLSINVTIAPDHMSPTPTITFRVWHPLSHDRMEILSWFLVERDA
PdoA2	MLQRSAFIHGTVPNLSINVLIGRDKKSMEVPMLTFRWLWRPLSHDTMEVWSWFLVEKDA
NdoB	LNKEIGDVRARIYR--SILNCTVFPNN-SMTCG*GVFKVWNPIDANTTEVWTYAIVEKDM
PdoA1	PEWLRDASQASYVNNRGPGGVFEQDDAEAWKAITESVQGPFAGEGLLN*YEMGMDLTP-LT
PdoA2	DEEFKQQSYETVYRTFGISGVFEQDDAETWRSITAGTQGILAGSQT*LNFMGMGVLTSD
NdoB	PEDLKRRLADSVQRTGPGAGFESDDNDNMETASQNGKKYQSRDSDLLSNLGFGEDEV-YG
PdoA1	DWPGPGGEALPSGYAEQNQRRFWGRWLEYMQPPAFGGRA-----
PdoA2	TWKGPGRPLSSGYAERNQREFWGRLL*LLTDSGDDASETEPKPQLLAQSR*TNAD*EVA
NdoB	DAVYPGVVGKSAIGETSYRGFYRAYQAHVSSSNWAEFEHASSTWHTELTKTTDR---

**Figure 4-2** – Comparaison des séquences des sous-unités  $\alpha$  des dioxygénases Pdo1, Pdo2 et NdoB. Les acides aminés surlignés en bleu sont ceux qui lient le centre [2Fe-2S] de type Rieske, en rouge les acides aminés de la poche de liaison du substrat dans NdoB. Les acides aminés marqués en bleu forment deux boucles qui bordent l'accès au site actif. Les étoiles rouges désignent les résidus de liaison du fer au site actif.

Peu d'étude ont été réalisées sur les sous-unités  $\beta$ . Certaines participent à la spécificité envers le substrat (Hirose *et al.*, 1994) alors que d'autres auraient un rôle purement structural, la spécificité de reconnaissance du substrat ne faisant alors intervenir que les sous-unités  $\alpha$ . Certains acides aminés des sous-unités  $\beta$  de dioxygénases semblent conservés (Tan *et al.*, 1994) : le résidu Asp<sub>41</sub> ainsi que le résidu Arg<sub>118</sub> auquel il se lie dans la naphthalène dioxygénase NdoB sont retrouvés dans les 3 sous-unités  $\beta$  PdoB1, PdoB2 et PdoB3. De plus, la partie C-terminale de ces trois sous-unités est chargée négativement, comme c'est le cas pour la naphthalène dioxygénase. Dans cette dernière, cette partie de la sous-unité est liée à deux arginines de la même protéine (Kauppi *et al.*, 1998); les résidus correspondants sont conservés dans les dioxygénases Pdo, suggérant que la liaison entre la partie C-terminale et les résidus

arginine observée dans la sous-unité  $\beta$  de naphthalène dioxygénase ait également lieu dans PdoB1, PdoB2 et PdoB3.

La sélectivité des deux arènes dioxygénases Pdo1 et Pdo2 a été étudiée. Elles ont toutes deux montré une sélectivité plutôt étroite vis-à-vis des HAP, Pdo1 catalysant principalement l'oxydation de HAP à 3 ou 4 noyaux aromatiques alors que Pdo2 oxyde plutôt les hydrocarbures à 2 ou 3 cycles.

Bien que Pdo2 soit capable d'oxyder le naphthalène, *Mycobacterium* sp. 6PY1 ne l'utilise pas. Deux hypothèses peuvent expliquer cela. Il se peut que le naphthalène ne pénètre pas dans la cellule bactérienne. Peu d'études ont été réalisées sur la pénétration des HAP dans les bactéries. Cependant, compte tenu des propriétés lipophiles du naphthalène, on peut s'attendre à ce qu'il diffuse à travers la membrane bactérienne, et de là, dans le cytosol, en fonction d'un équilibre qui dépend de coefficient de partage octanol/eau (Sikkema *et al.*, 1995). Une seconde hypothèse plus probable est que les enzymes de dégradation du naphthalène en salicylate ne soient pas présentes chez *Mycobacterium* sp. 6PY1, puisque le métabolisme du phénanthrène passe par le phtalate et non le salicylate (Krivobok *et al.*, 2003) (Figure 4-1).

## **2. PERSPECTIVES**

### **A. Etude structurale et fonctionnelle des arène dioxygénases**

L'obtention des structures des dioxygénases Pdo1 et Pdo2 par cristallographie devrait répondre à des questions fondamentales concernant la sélectivité des dioxygénases, ainsi que la regio- et stéréochimie des réactions de dihydroxylation qu'elles catalysent. En effet, seules deux structures de dioxygénases ont été résolues à ce jour (Furusawa *et al.*, 2004, Kauppi *et al.*, 1998). La résolution de la structure de complexes enzyme-substrats sera aussi une étape importante dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la reconnaissance des substrats. Dans le cas de Pdo1, les tentatives de cristallisation peuvent se heurter au problème de l'instabilité de la protéine. Dans ce cas, il sera peut-être nécessaire de trouver des solutions pour la stabiliser et ainsi faciliter la purification. Une des stratégies pourrait être de sélectionner par mutagenèse aléatoire des variants de l'enzyme plus stable en température.

D'une manière plus générale, dès lors que les gènes sont clonés et qu'on peut doser l'activité des enzymes recombinantes *in vivo*, on peut envisager d'employer les méthodes de mutagenèse aléatoire ou d'évolution moléculaire dirigée (DNA shuffling) pour sélectionner des enzymes dont l'activité catalytique serait augmentée, notamment vis-à-vis des HAP résistants à la dégradation, comme le fluoranthène, le benzo fluoranthène et le benzo[a]pyrène.

## **B. Identification des transporteurs d'électrons associés**

Aucun système de transport d'électrons associé aux arène dioxygénases n'a pu être identifié dans le génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1, ni dans celui de souches apparentées. Afin d'étudier les dioxygénases dans les meilleures conditions, il est nécessaire d'identifier les protéines transporteurs d'électrons. Plusieurs pistes sont envisageables pour atteindre cet objectif : la purification directe à partir de cultures de *Mycobacterium* sp 6PY1 ayant poussée sur phénanthrène, une approche génétique par PCR. Dans la séquence de 37 kb du génome de *Mycobacterium* sp. PYR-1, deux gènes codant pour une ferrédoxine et une réductase ont été identifiés dans le cluster *pht* de dégradation du phtalate. Il est possible que les protéines correspondantes soient aussi capables de fonctionner avec une arène dioxygénase. Par exemple, chez *Sphingomonas* CHY-1, il a été démontré que le même couple de protéines réductase/ferrédoxine s'associait soit à une HAP dioxygénase, soit à une enzyme de type salicylate hydroxylase (Demanèche *et al.*, 2004). On peut donc envisager de cloner les gènes associés à la phtalate dioxygénase chez *Mycobacterium* sp. 6PY1 et de les co-exprimer avec les enzymes Pdo1 ou Pdo2 pour essayer de reconstituer des complexes enzymatiques fonctionnels.

## **C. Régulation de l'expression des gènes cataboliques**

La très grande similarité qu'il existe entre les séquences de Pdo1 et de Pdo3 laisse présager que peu de différences seront trouvées entre les deux quant à leur sélectivité. Il sera donc important de comprendre le rôle de chacune de ces deux dioxygénases afin de savoir l'utilité de la bactérie à conserver deux copies de ces gènes.



Il convient de savoir si les deux dioxygénases sont exprimées en présence de pyrène. L'intégration d'un marqueur permettant de détecter l'expression d'une dioxygénase par mutation dirigée devrait répondre à cette interrogation. Le marqueur peut-être de type *lacZ* ou GFP. Après intégration du marqueur dans une des copies des gènes de dioxygénase, il faudra déterminer, par séquençage, l'identité de la dioxygénase dans laquelle le marqueur s'est inséré.

Cette expérience devrait également préciser l'importance de chacune des dioxygénases Pdo1 et Pdo3 dans l'oxydation du pyrène. En effet, l'insertion du gène rapporteur dans une copie de gène de dioxygénase aura pour effet d'inactiver ce gène, renseignant ainsi sur son implication dans l'hydroxylation du pyrène.

La création d'une banque de mutants par transposition de *Mycobacterium* sp. 6PY1 pourrait amener à l'identification de nouveaux gènes de la voie de dégradation du pyrène, notamment ceux qui codent les enzymes catalysant les réactions amenant au 3,4-dihydroxyphénanthrène, ainsi qu'à l'identification d'un régulateur de l'expression de ces gènes. Pour faire cette banque de mutants, on peut envisager l'utilisation du plasmide pCG79 qui comporte le transposon *Tn611* et qui a été utilisé avec succès chez *Mycobacterium smegmatis* (Guilhot *et al.*, 1994).

# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

- Armengaud, J., B. Happe et K. N. Timmis (1998). "Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome." J. Bacteriol. **180**(15): 3954-3966.
- Armengaud, J. et K. N. Timmis (1997). "Molecular characterization of Fdx1, a putidaredoxin-type [2Fe-2S] ferredoxin able to transfer electrons to the dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. RW1." Eur J Biochem **247**(3): 833-842.
- Armengaud, J. et K. N. Timmis (1998). "The reductase RedA2 of the multi-component dioxin dioxygenase system of *Sphingomonas* sp. RW1 is related to class-I cytochrome P450-type reductases." Eur J Biochem **253**(2): 437-444.
- Ballerini, D., C. Gatellier et T. Vogel (1998). "Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués." Rapport pour l'ADEME: 248 pages.
- Barnsley, E. A. (1983). "Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-carboxybenzalpyruvate." J Bacteriol **154**(1): 113-117.
- Boldrin, B., A. Tiehm et C. Fritzsche (1993). "Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp." Appl Environ Microbiol **59**(6): 1927-1930.
- Boonchan, S., M. L. Britz et G. A. Stanley (1998). "Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *stenotrophomonas maltophilia*." Biotechnol Bioeng **59**(4): 482-494.
- Bouchez, M., D. Blanchet et J. P. Vandecasteele (1995). "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism." Appl Microbiol Biotechnol **43**(1): 156-164.
- Brookes, P. (1977). "Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons." Mutat Res **39**(3-4): 257-283.
- Butler, C. S. et J. R. Mason (1997). "Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases." Adv Microb Physiol **38**: 47-84.
- Carredano, E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury, R. E. Parales, J. V. Parales, K. Lee, D. T. Gibson, H. Eklund et S. Ramaswamy (2000). "Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding." J Mol Biol **296**(2): 701-712.
- Cerniglia, C. E. (1992). "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons." Biodegradation **3**: 351-368.

- Chu, W. et C. Y. Kwan (2003). "Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system." Chemosphere **53**(1): 9-15.
- Chun, H. K., Y. Ohnishi, N. Misawa, K. Shindo, M. Hayashi, S. Harayama et S. Horinouchi (2001). "Biotransformation of phenanthrene and 1-methoxynaphthalene with *Streptomyces lividans* cells expressing a marine bacterial phenanthrene dioxygenase gene cluster." Biosci Biotechnol Biochem **65**(8): 1774-1781.
- Churchill, S. A., J. P. Harper et P. F. Churchill (1999). "Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons." Appl Environ Microbiol **65**(2): 549-552.
- Collier, L. S., G. L. Gaines et E. L. Neidle (1998). "Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator." J Bacteriol **180**(9): 2493-2501.
- Costes, J.-M. et V. Druelle (1997). "Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la réhabilitation des anciens site industriels." Revue de l'Institut Français du Pétrole **52**(4): 425-440.
- Cowles, C. E., N. N. Nichols et C. S. Harwood (2000). "BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **182**(22): 6339-6346.
- de Lorenzo, V., L. Eltis, B. Kessler et K. N. Timmis (1993). "Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacIq/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes." Gene **123**(1): 17-24.
- Dean-Ross, D. et C. E. Cerniglia (1996). "Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*." Appl Microbiol Biotechnol **46**(3): 307-312.
- Demanèche, S., C. Meyer, J. Micoud, M. Louwagie, J. C. Willison et Y. Jouanneau (2004). "Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons." Appl Environ Microbiol **70**: 6714-6725.
- Denissenko, MF., A. Pao, M. Tang et GP. Pfeifer (1996). "Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53." Science **274**: 430-432.
- Ensley, B. D. et D. T. Gibson (1983). "Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component." J Bacteriol **155**(2): 505-511.
- Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett et D. T. Gibson (1983). "Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo." Science **222**(4620): 167-169.

- Franklin, F. C., M. Bagdasarian, M. M. Bagdasarian et K. N. Timmis (1981). "Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7458-7462.
- Fredrickson, J. K., D. L. Balkwill, G. R. Drake, M. F. Romine, D. B. Ringelberg et D. C. White (1995). "Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface." Appl Environ Microbiol **61**(5): 1917-1922.
- Furusawa, Y., V. Nagarajan, M. Tanokura, E. Masai, M. Fukuda et T. Senda (2004). "Crystal structure of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1." J Mol Biol **342**(3): 1041-1052.
- Ge, Y. et L. D. Eltis (2003). "Characterization of hybrid toluate and benzoate dioxygenases." J Bacteriol **185**(18): 5333-5341.
- Gibson, D. T., J. R. Koch et R. E. Kallio (1968). "Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene." Biochemistry **7**(7): 2653-2662.
- Gibson, D. T., V. Mahadevan, D. M. Jerina, H. Yogi et H. J. Yeh (1975). "Oxidation of the carcinogens benzo [a] pyrene and benzo [a] anthracene to dihydrodiols by a bacterium." Science **189**(4199): 295-297.
- Gonzalez-y-Merchand, J. A., I. Estrada-Garcia, M. J. Colston et R. A. Cox (1996). "A novel method for the isolation of mycobacterial DNA." FEMS Microbiol Lett **135**(1): 71-77.
- Goyal, A. K. et G. J. Zylstra (1996). "Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39." Appl Environ Microbiol **62**(1): 230-236.
- Grund, E., B. Denecke et R. Eichenlaub (1992). "Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4." Appl Environ Microbiol **58**(6): 1874-1877.
- Guilhot, C., I. Otal, I. Van Rompaey, C. Martin et B. Gicquel (1994). "Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries." J Bacteriol **176**(2): 535-539.
- Haddock, J. D. et D. T. Gibson (1995). "Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400." J Bacteriol **177**(20): 5834-5839.
- Haigler, B. E. et D. T. Gibson (1990a). "Purification and properties of ferredoxinNAP, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816." J Bacteriol **172**(1): 465-468.

- Haigler, B. E. et D. T. Gibson (1990b). "Purification and properties of NADH-ferredoxinNAP reductase, a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816." J Bacteriol **172**(1): 457-464.
- Harayama, S., M. Kok et E. L. Neidle (1992). "Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases." Annu Rev Microbiol **46**: 565-601.
- Harmsen, J. (1991). "Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils." On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment, R. E.-B. Hinchee, ed.
- Heitkamp, M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller et C. E. Cerniglia (1988). "Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products." Appl Environ Microbiol **54**(10): 2556-2565.
- Hirose, J., Suyama, A., Hayashida, S. et K. Furukawa (1994). "Construction of hybrid biphenyl (bph) and toluene (tod) genes for functional analysis of aromatic ring dioxygenases." Gene **138**: 27-33.
- Hulsmeyer, M., H. J. Hecht, K. Niefind, B. Hofer, L. D. Eltis, K. N. Timmis et D. Schomburg (1998). "Crystal structure of cis-biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase from a PCB degrader at 2.0 Å resolution." Protein Sci **7**(6): 1286-1293.
- Hurtubise, Y., D. Barriault, J. Powlowski et M. Sylvestre (1995). "Purification and characterization of the *Comamonas testosteroni* B-356 biphenyl dioxygenase components." J Bacteriol **177**(22): 6610-6618.
- IARC (1983). "Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to human - Polynuclear aromatic compounds. Part 1 - Chemical, environmental and experimental data - benzo(a)pyrene." Journal **32**: 211-224.
- Iben, I. E., W. A. Edelstein, R. B. Sheldon et A. P. Shapiro (1996). "Thermal blanket for in situ remediation of surficial contamination: a pilot test." Environ Sci Technol **30**: 3144-3154.
- Ish-Horowicz, D. et J. F. Burke (1981). "Rapid and efficient cosmid cloning." Nucleic Acids Res **9**(13): 2989-2998.
- Iwabuchi, T. et S. Harayama (1998). "Biochemical and genetic characterization of trans-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from a phenanthrene-degrading *Nocardioides* strain." J Bacteriol **180**(4): 945-949.
- Jeffrey, A. M., H. J. C. Yeh, D. M. Jerina, T. R. Patel, J. F. Davey et D. T. Gibson (1975). "Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*." Biochemistry **14**(3): 575-584.
- Jones, R. M., B. Britt-Compton et P. A. Williams (2003). "The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Ralstonia* sp. strain U2 are an operon that is regulated by NagR, a LysR-type transcriptional regulator." J Bacteriol **185**(19): 5847-5853.

- Jouanneau, Y., Willison, J.C. et D. Rodarie (1999). "Dégradation microbiologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques." Rapport pour l'ADEME: 156 pages.
- Jouanneau, Y., Willison, J.C., Meyer, C., Krivobok, S., Chevron, N., Besombes, J-L. et G. Blake (2005). "Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation." Environ. Sci. Technol. **39**: 5729-5735.
- Juhasz, A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley (1997). "Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*." J. Appl. Microbiol. **83**: 189-198.
- Kanally, R. A. et S. Harayama (2000). "Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria." J Bacteriol **182**(8): 2059-2067.
- Kang, H., S. Y. Hwang, Y. M. Kim, E. Kim, Y. S. Kim, S. K. Kim, S. W. Kim, C. E. Cerniglia, K. L. Shuttlesworth et G. J. Zylstra (2003). "Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain." Can J Microbiol **49**(2): 139-144.
- Karlsson, A., J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund et S. Ramaswamy (2003). "Crystal structure of naphthalene dioxygenase: side-on binding of dioxygen to iron." Science **299**(5609): 1039-1042.
- Kastner, M., M. Breuer-Jammali et M. B. (1994). "Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)." Appl Microbiol Biotechnol **41**: 267-273.
- Kastner, M., M. Breuer-Jammali et B. Mahro (1998). "Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil." Appl Environ Microbiol **64**(1): 359-362.
- Kauppi, B., K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund et S. Ramaswamy (1998). "Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase." Structure **6**(5): 571-586.
- Khan, A. A., R. F. Wang, W. W. Cao, D. R. Doerge, D. Wennerstrom et C. E. Cerniglia (2001). "Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1." Appl Environ Microbiol **67**(8): 3577-3585.
- Kimura, N., A. Nishi, M. Goto et K. Furukawa (1997). "Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally." J Bacteriol **179**(12): 3936-3943.
- Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop et K. M. Peterson (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." Gene **166**(1): 175-176.



- Krivobok, S., S. Kuony, C. Meyer, M. Louwagie, J. C. Willison et Y. Jouanneau (2003). "Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases." J Bacteriol **185**(13): 3828-3841.
- Labbe, D., J. Garnon et P. C. Lau (1997). "Characterization of the genes encoding a receptor-like histidine kinase and a cognate response regulator from a biphenyl/polychlorobiphenyl-degrading bacterium, *Rhodococcus* sp. strain M5." J Bacteriol **179**(8): 2772-2776.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Larkin, M. J., C. C. R. Allen, L. A. Kulakov et D. A. Lipscomb (1999). "Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038." J. Bacteriol. **181**(19): 6200-6204.
- Lau, P. C., Y. Wang, A. Patel, D. Labbe, H. Bergeron, R. Brousseau, Y. Konishi et M. Rawlings (1997). "A bacterial basic region leucine zipper histidine kinase regulating toluene degradation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(4): 1453-1458.
- Maeda, T., Y. Takahashi, H. Suenaga, A. Suyama, M. Goto et K. Furukawa (2001). "Functional analyses of Bph-Tod hybrid dioxygenase, which exhibits high degradation activity toward trichloroethylene." J Biol Chem **276**(32): 29833-29838.
- Moody, J. D., D. R. Doerge, J. P. Freeman et C. E. Cerniglia (2002). "Degradation of biphenyl by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1." Appl Microbiol Biotechnol **58**(3): 364-369.
- Moody, J. D., J. P. Freeman, D. R. Doerge et C. E. Cerniglia (2001). "Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1." Appl Environ Microbiol **67**(4): 1476-1483.
- Nakai, C., H. Kagamiyama, M. Nozaki, T. Nakazawa, S. Inouye, Y. Ebina et A. Nakazawa (1983). "Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2." J Biol Chem **258**(5): 2923-2928.
- Nam, J. W., H. Nojiri, T. Yoshida, H. Habe, H. Yamane et T. Omori (2001). "New classification system for oxygenase components involved in ring-hydroxylating oxygenations." Biosci Biotechnol Biochem **65**(2): 254-263.
- Newman, L. A. et C. M. Reynolds (2004). "Phytodegradation of organic compounds." Curr Opin Biotechnol **15**(3): 225-230.
- O'Leary, N. D., W. A. Duetz, A. D. Dobson et K. E. O'Connor (2002). "Induction and repression of the sty operon in *Pseudomonas putida* CA-3 during growth on phenylacetic acid under organic and inorganic nutrient-limiting continuous culture conditions." FEMS Microbiol Lett **208**(2): 263-268.

- Ogawa, N. et K. Miyashita (1999). "The chlorocatechol-catabolic transposon *Tn5707* of *Alcaligenes eutrophus* NH9, carrying a gene cluster highly homologous to that in the 1,2,4-trichlorobenzene-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. strain P51, confers the ability to grow on 3-chlorobenzoate." Appl Environ Microbiol **65**(2): 724-731.
- Olszewska, E. et K. Jones (1988). "Vacuum blotting enhances nucleic acid transfer." Trends Genet **4**(4): 92-94.
- Parales, R. E. (2003). "The role of active-site residues in naphthalene dioxygenase." J Ind Microbiol Biotechnol **30**(5): 271-278.
- Parales, R. E., K. Lee, S. M. Resnick, H. Jiang, D. J. Lessner et D. T. Gibson (2000). "Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme." J. Bacteriol. **182**(6): 1641-1649.
- Parales, R. E., J. V. Parales et D. T. Gibson (1999). "Aspartate 205 in the catalytic domain of naphthalene dioxygenase is essential for activity." J Bacteriol **181**(6): 1831-1837.
- Pinyakong, O., H. Habe et T. Omori (2003). "The unique aromatic catabolic genes in sphingomonads degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)." J Gen Appl Microbiol **49**(1): 1-19.
- Randerath, K., E. Randerath, G. D. Zhou, N. Supunpong, L. Y. He, T. J. McDonald et K. C. Donnelly (1999). "Genotoxicity of complex PAH mixtures recovered from contaminated lake sediments as assessed by three different methods." Environ Mol Mutagen **33**(4): 303-312.
- Resnick, S. M. et D. T. Gibson (1996). "Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4." Appl Environ Microbiol **62**(11): 4073-4080.
- Rieske, J. S., H. Baum, C. D. Stoner et S. H. Lipton (1967). "On the antimycin-sensitive cleavage of complex 3 of the mitochondrial respiratory chain." J Biol Chem **242**(21): 4854-4866.
- Rodarie, D. et Y. Jouanneau (2001). "Genetic and biochemical characterization of the biphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* sp. B4." J Microbiol Biotechnol **11**(5): 763-771.
- Romine, M. F., J. K. Fredrickson et S. M. Li (1999a). "Induction of aromatic catabolic activity in *Sphingomonas aromaticivorans* strain F199." J Ind Microbiol Biotechnol **23**(4-5): 303-313.
- Romine, M. F., L. C. Stillwell, K. K. Wong, S. J. Thurston, E. C. Sisk, C. Sensen, T. Gaasterland, J. K. Fredrickson et J. D. Saffer (1999b). "Complete sequence of a 184-kilobase catabolic plasmid from *Sphingomonas aromaticivorans* F199." J Bacteriol **181**(5): 1585-1602.

- Rothmel, R. K., T. L. Aldrich, J. E. Houghton, W. M. Coco, L. N. Ornston et A. M. Chakrabarty (1990). "Nucleotide sequencing and characterization of *Pseudomonas putida catR*: a positive regulator of the *catBC* operon is a member of the LysR family." J Bacteriol **172**(2): 922-931.
- Saito, A., T. Iwabuchi et S. Harayama (1999). "Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7." Chemosphere **38**(6): 1331-1337.
- Saito, A., T. Iwabuchi et S. Harayama (2000). "A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **182**(8): 2134-2141.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch et T. and Maniatis (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue et D. Warshawsky (1996). "Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site." Appl Environ Microbiol **62**(1): 13-19.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex et M. C. Peitsch (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server." Nucleic Acids Res **31**(13): 3381-3385.
- Shingler, V., M. Bartilson et T. Moore (1993). "Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVII50 and identification of DmpR as a member of the NtrC family of transcriptional activators." J Bacteriol **175**(6): 1596-1604.
- Sho, M., C. Hamel et C. W. Greer (2004). "Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium* sp. strain S65." FEMS Microbiology Ecology **48**(2): 209-220.
- Sikkema, J., J. A. de Bont et B. Poolman (1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons." Microbiol Rev **59**(2): 201-222.
- Simon, M. J., T. D. Osslund, R. Saunders, B. D. Ensley, S. Suggs, A. Harcourt, W. C. Suen, D. L. Cruden, D. T. Gibson et G. J. Zylstra (1993). "Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4." Gene **127**(1): 31-37.
- Spooner, R. A., K. Lindsay et F. C. Franklin (1986). "Genetic, functional and sequence analysis of the *xylR* and *xylS* regulatory genes of the TOL plasmid pWW0." J Gen Microbiol **132** (Pt 5): 1347-1358.
- Stingley, R. L., A. A. Khan et C. E. Cerniglia (2004). "Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1." Biochem Biophys Res Commun **322**(1): 133-146.

- Story, S. P., S. H. Parker, J. D. Kline, T. R. Tzeng, J. G. Mueller et E. L. Kline (2000). "Identification of four structural genes and two putative promoters necessary for utilization of naphthalene, phenanthrene, fluoranthene by *Sphingomonas paucimobilis* var. EPA505." Gene **260**(1-2): 155-169.
- Szeliga, J. et A. Dipple (1998). "DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides" Chem. Res. Toxicol. **11**: 1-11.
- Tan, H.-M. et C.-M., Cheong (1994). "Substitution of the ISPa subunit of biphenyl dioxygenase from *Pseudomonas* results in a modification of the enzyme activity." Biochem. Biophys. Res. Commun. **204**: 912-917.
- Tropel, D. et J. R. Van Der Meer (2004). "Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 474-500.
- Vaillancourt, F. H., G. Labbe, N. M. Drouin, P. D. Fortin et L. D. Eltis (2002). "The mechanism-based inactivation of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase by catecholic substrates." J Biol Chem **277**(3): 2019-2027.
- van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama et A. J. Zehnder (1992). "Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds." Microbiol Rev **56**(4): 677-694.
- Walter, U., M. Beyer, J. Klein et H.-J. Rehm (1991). "Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1." Appl Microbiol Biotechnol **34**: 671-676.
- Wilson, S. C. et K. C. Jones (1993). "Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review." Environ Pollut **81**(3): 229-249.
- Wolfe, M. D., J. V. Parales, D. T. Gibson et J. D. Lipscomb (2001). "Single turnover chemistry and regulation of O<sub>2</sub> activation by the oxygenase component of naphthalene 1,2-dioxygenase." J Biol Chem **276**(3): 1945-1953.
- Yeates, C., A. J. Holmes et M. R. Gillings (2000). "Novel forms of ring-hydroxylating dioxygenases are widespread in pristine and contaminated soils." Environ Microbiol **2**(6): 644-653.
- Yen, K. M. et I. C. Gunsalus (1982). "Plasmid gene organization: naphthalene/salicylate oxidation." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(3): 874-878.
- Yen, K. M. et C. M. Serdar (1988). "Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads." Crit Rev Microbiol **15**(3): 247-268.
- You, I. S., D. Ghosal et I. C. Gunsalus (1988). "Nucleotide sequence of plasmid NAH7 gene *nahR* and DNA binding of the *nahR* product." J Bacteriol **170**(12): 5409-5415.

- Yu, C. L., R. E. Parales et D. T. Gibson (2001). "Multiple mutations at the active site of naphthalene dioxygenase affect regioselectivity and enantioselectivity." J Ind Microbiol Biotechnol **27**(2): 94-103.
- Zielinski, M., S. Backhaus et B. Hofer (2002). "The principal determinants for the structure of the substrate-binding pocket are located within a central core of a biphenyl dioxygenase alpha subunit." Microbiology **148**(8): 2439-2448.
- Zuniga, M. C., D. R. Durham et R. A. Welch (1981). "Plasmid- and chromosome-mediated dissimilation of naphthalene and salicylate in *Pseudomonas putida* PMD-1." J Bacteriol **147**(3): 836-843.

# **ANNEXE**



## ANNEXE

Article : Krivobok S., Kuony S., Meyer C., Louwagie M., Willison J. C., Jouanneau Y. (2003).  
Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two  
ring-hydroxylating dioxygenases. *J. Bacteriol.*, **185**(13): 3828-3841





## Identification of Pyrene-Induced Proteins in *Mycobacterium* sp. Strain 6PY1: Evidence for Two Ring-Hydroxylating Dioxygenases

Serge Krivobok,<sup>1,2</sup> Sylvain Kuony,<sup>1</sup> Christine Meyer,<sup>1</sup> Mathilde Louwagie,<sup>3</sup>  
John C. Willison,<sup>1</sup> and Yves Jouanneau<sup>1\*</sup>

Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés<sup>1</sup> and Laboratoire de Chimie des Protéines,<sup>3</sup> Département de Réponse et Dynamique Cellulaires, CNRS UMR 5092, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble Cedex 9, and Equipe Perturbations Environnementales et Xénobiotiques, Laboratoire d'Écologie Alpine, UMR CNRS 5553, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, BP 53, F-38041 Grenoble Cedex 9,<sup>2</sup> France

Received 7 March 2003/Accepted 14 April 2003

In this study, the enzymes involved in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation were investigated in the pyrene-degrading *Mycobacterium* sp. strain 6PY1. [<sup>14</sup>C]pyrene mineralization experiments showed that bacteria grown with either pyrene or phenanthrene produced high levels of pyrene-catabolic activity but that acetate-grown cells had no activity. As a means of identifying specific catabolic enzymes, protein extracts from bacteria grown on pyrene or on other carbon sources were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. Pyrene-induced proteins were tentatively identified by peptide sequence analysis. Half of them resembled enzymes known to be involved in phenanthrene degradation, with closest similarity to the corresponding enzymes from *Nocardioide* sp. strain KP7. The genes encoding the terminal components of two distinct ring-hydroxylating dioxygenases were cloned. Sequence analysis revealed that the two enzymes, designated Pdo1 and Pdo2, belong to a subfamily of dioxygenases found exclusively in gram-positive bacteria. When overproduced in *Escherichia coli*, Pdo1 and Pdo2 showed distinctive selectivities towards PAH substrates, with the former enzyme catalyzing the dihydroxylation of both pyrene and phenanthrene and the latter preferentially oxidizing phenanthrene. The catalytic activity of the Pdo2 enzyme was dramatically enhanced when electron carrier proteins of the phenanthrene dioxygenase from strain KP7 were coexpressed in recombinant cells. The Pdo2 enzyme was purified as a brown protein consisting of two types of subunits with *M<sub>r</sub>*s of about 52,000 and 20,000. Immunoblot analysis of cell extracts from strain 6PY1 revealed that Pdo1 was present in cells grown on benzoate, phenanthrene, or pyrene and absent in acetate-grown cells. In contrast, Pdo2 could be detected only in PAH-grown cells. These results indicated that the two enzymes were differentially regulated depending on the carbon source used for growth.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous contaminants in soils and sediments and are of environmental concern because of their mutagenic and/or carcinogenic effects. While low-molecular-weight PAHs (composed of two or three rings) are readily degraded by bacteria, PAHs consisting of four rings or more are recalcitrant to biodegradation and persist in the environment (6, 41). The biodegradation of low-molecular-weight PAHs, especially naphthalene, has been extensively studied with pseudomonads, leading to a good understanding of the bacterial catabolic pathway (42). On the other hand, relatively little information is available on the metabolism of high-molecular-weight PAHs (20). A number of bacterial isolates capable of pyrene mineralization have been described. Most of them are actinomycetes and belong to the genus *Mycobacterium* (2, 7, 37), *Rhodococcus* (4, 40), or *Gordonia* (21). A few pyrene-degrading strains have been identified as gram-negative species, including *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas fluorescens* (3), *Sphingomonas paucimobilis* (22), and *Burkholderia cepacia* (19).

Early studies on the catabolism of pyrene by a *Mycobacterium* species led to the identification of several ring oxidation products, including pyrene 4,5-dihydrodiol and 4-phenanthroic

acid (15). Later studies conducted with other *Mycobacterium* strains identified phenanthrene 4,5-dicarboxylic acid as another intermediate metabolite (7, 37). Based on these findings, a pathway of pyrene degradation by *Mycobacterium* species has been proposed which likely involves a dioxygenase for catalysis of the initial attack of the aromatic substrate (6, 7, 20) (Fig. 1). None of the enzymes involved in the catabolism of pyrene has yet been described, except for a polycyclic aromatic ring dioxygenase recently identified in the pyrene-degrading *Mycobacterium* strain PYR-1 (24). In this study, a *Mycobacterium* strain selected for its ability to grow with pyrene as the sole carbon and energy source was used to identify proteins involved in pyrene catabolism. For this purpose, proteins from bacteria grown on pyrene and other carbon sources were subjected to metabolic labeling and two-dimensional (2D) electrophoresis. This approach allowed the detection of several pyrene-specific polypeptides, some of which were identified by N-terminal and internal peptide sequencing as putative catabolic enzymes. Two distinct ring-hydroxylating dioxygenases were found to be coexpressed in PAH-grown cells. The genes encoding the two pyrene-induced dioxygenases have been cloned, sequenced, and overexpressed in *Escherichia coli*.

\* Corresponding author. Mailing address: CEA-Grenoble, DRDC/BBSI, F-38054 Grenoble Cedex 9, France. Phone: 33 (0)4.38.78.43.10. Fax: 33 (0)4.38.78.51.85. E-mail: yjouanneau@cea.fr.

### MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Pyrene, phenanthrene, antibiotics, and most other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Silicone oil,

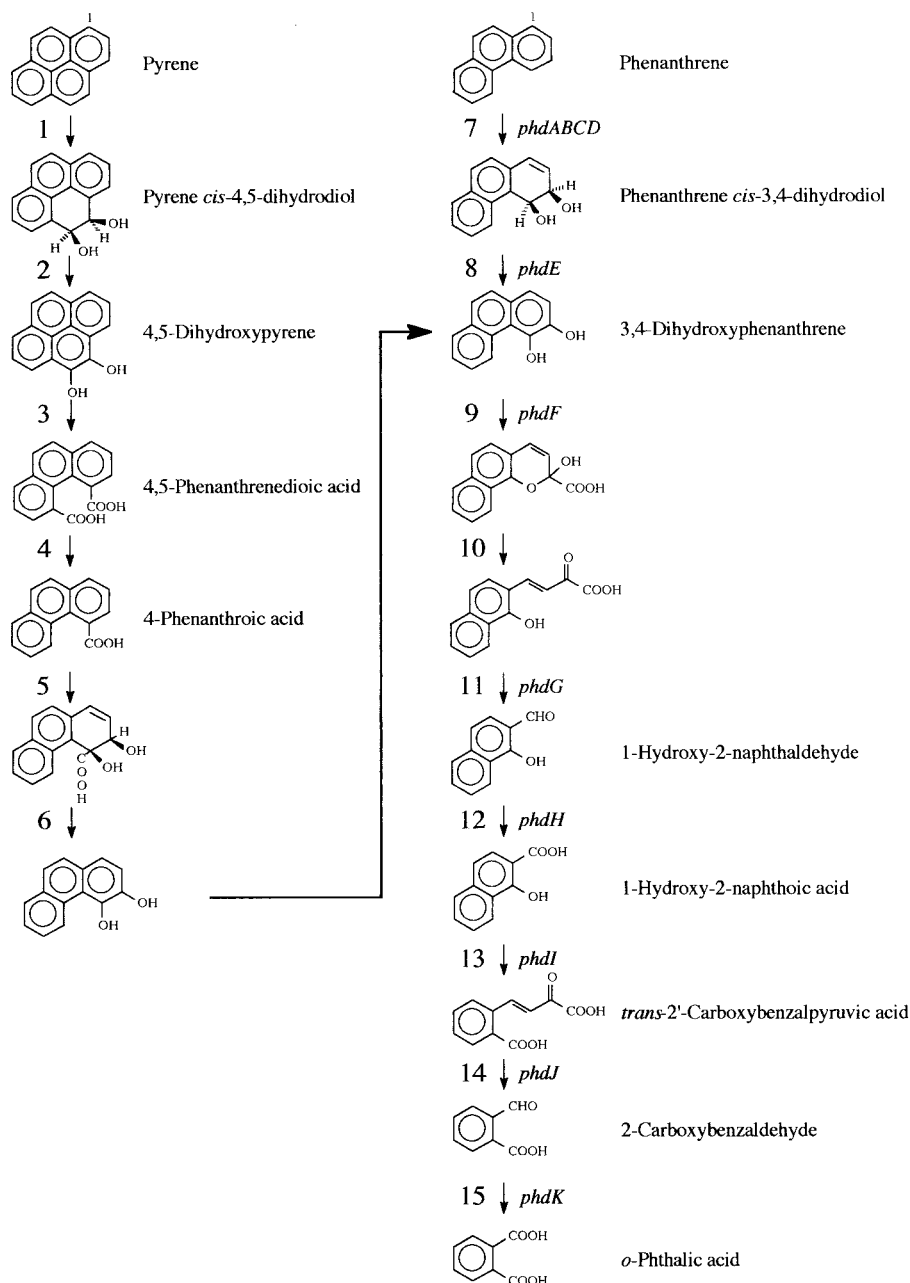


FIG. 1. Proposed metabolic pathway for the biodegradation of pyrene and phenanthrene in *Mycobacterium* species. Steps 1 to 6 are specific to the degradation of pyrene (20), and steps 7 to 15 represent the *o*-phthalate pathway of phenanthrene degradation, with steps 9 to 15 being common to the degradation pathways of the two PAHs. The genes encoding the enzymes of the phenanthrene degradation pathway, which have been identified in *Nocardiothelpha* sp. strain KP7 (16, 17, 34), are shown in italics. The enzyme activities thought to be involved in the catalysis of each step shown are as follows: (1) ring-hydroxylating dioxygenase; (2) dihydrodiol dehydrogenase; (3) intradiol dioxygenase; (4) decarboxylase; (5) ring-hydroxylating dioxygenase; (6) dehydrogenase-decarboxylase; (7) ring-hydroxylating dioxygenase; (8) dihydrodiol dehydrogenase; (9) extradiol dioxygenase; (10) isomerase; (11) hydratase-aldolase; (12) aldehyde dehydrogenase; (13) ring-cleaving dioxygenase; (14) hydratase-aldolase; (15) aldehyde dehydrogenase.

type 47V20, was from Sodipro (Echirolles, France). [4,5,9,10-<sup>14</sup>C]pyrene was from Amersham Biosciences (Orsay, France). Oligonucleotides were purchased from Genome Express (Montreuil, France). Restriction enzymes were from Promega France (Charbonnières) or Fermentas (Euromedex, Mundolsheim, France). Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium).

**Bacterial strains, plasmids, and culture conditions.** *Mycobacterium* strain 6PY1 was isolated from PAH-contaminated soil by successive enrichment cultures with pyrene as the sole carbon source, as will be described elsewhere (J. C. Willison, unpublished results). This bacterium was grown on a mineral salts medium (MSM) (40) supplemented with one of the following substrates used as a sole carbon and energy source: acetate (30 mM), benzoate (5 mM), phenan-

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used

Bacterial strain or plasmid	Relevant genotype and/or properties	Source or reference
<b>Strains</b>		
<i>Mycobacterium</i> sp. strain 6PY1	Wild type	This study
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1</i> $\lambda$ <sup>-</sup> <i>recA1 gyrA96 relA1</i> $\Delta$ ( <i>argF-lacZYA</i> )U169 $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF <sup>+</sup>	$\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10-Gold Kan	Tet <sup>r</sup> $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10(Tet <sup>r</sup> ) Tn5 (Kan <sup>r</sup> ) Amy]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)(pLysS)	B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> $\lambda$ (DE3) [pLysS Cam <sup>r</sup> ]	Promega
<i>E. coli</i> BL21AI	B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
<b>Plasmids</b>		
pPCR-Script	Ap <sup>r</sup> , cloning vector	Stratagene
pCR2.1	Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , T-cloning vector	Invitrogen
pGEM-T Easy	Ap <sup>r</sup> , T-cloning vector	Promega
pCR-Blunt II-TOPO	Kan <sup>r</sup> , cloning vector	Invitrogen
pET9a	Kan <sup>r</sup> , expression vector	Novagen
pBBR1MCS-5	Gm <sup>r</sup> , expression vector	26
pSK-B3	pCR2.1 containing a 372-bp PCR fragment (5' end of <i>pdoA1</i> )	This study
pSKU03	pPCR-Script containing <i>pdoA1</i>	This study
pSKU04	pPCR-Script containing <i>pdoB1</i>	This study
pSKU05	pET9a containing <i>pdoB1</i>	This study
pSKU06	pET9a containing <i>pdoA1B1</i>	This study
pSKU07	$\lambda$ ZAP phagemid containing a 2.3-kb fragment carrying <i>pdoA2B2</i>	This study
pSKU08	pCR-Blunt II-TOPO containing <i>pdoA2B2</i>	This study
pSKU09	pET9a containing <i>pdoA2B2</i>	This study
pSKU10	pGEM-T Easy with a 1.2-kb PCR insert carrying <i>pdoB2</i>	This study
pHA171	PT7-7 carrying the <i>phdABCD</i> genes from strain KP7	34
pDRCD	pDRIVE containing <i>phdCD</i>	This study
pBRCD	PBBR1MCS-5 containing <i>phdCD</i>	This study

threne (0.5 g/liter), or pyrene (0.1 g/liter). The latter two substrates were supplied as solutions in silicone oil, so that the ratio of the organic phase to the aqueous phase was 1:5. Growth took place at 25°C in Erlenmeyer flasks incubated in a rotary shaker at 150 rpm. Bacterial density was measured spectrophotometrically as the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>).

*E. coli* strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Strains DH5 $\alpha$  and BL21(DE3)(pLysS) or BL21AI were used for general cloning and protein expression, respectively. Culture was carried out on rich broth (Luria-Bertani [LB]) containing appropriate antibiotics.

**[<sup>14</sup>C]pyrene mineralization experiments.** [<sup>14</sup>C]pyrene mineralization experiments were carried out in 33-ml Warburg flasks closed with rubber stoppers fitted on the two outlets. A mixture of 0.4  $\mu$ Ci of [4,5,9,10-<sup>14</sup>C]pyrene and 100 nmol of unlabeled pyrene dissolved in acetone was introduced into empty flasks, and the solvent was allowed to evaporate. Then, 2 ml of strain 6PY1 suspension with an OD<sub>600</sub> of around 3.0 was placed in the main chamber of the flask and 0.4 ml of 1N NaOH was added in the central well. Flasks were incubated at room temperature on a reciprocal shaker. The <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced by pyrene mineralization and trapped in NaOH was estimated by scintillation counting. For this purpose, the NaOH solution was withdrawn at time intervals from the central well with a syringe and replaced by the same volume of freshly prepared solution. Results from duplicate flasks were averaged and expressed as the number of nanomoles of [<sup>14</sup>C]pyrene mineralized into CO<sub>2</sub> normalized to the protein content of the bacterial samples. Control flasks were incubated with 0.1 mg of chloramphenicol/ml.

**Preparation of bacterial protein extracts.** Cultures were harvested at 4°C by centrifugation for 15 min at 15,000  $\times$  g. Pellets were washed twice in 10 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) and resuspended in two volumes of sonication buffer (0.1 M Tris-HCl [pH 7.5] containing 0.01 M EDTA). The bacterial suspensions were transferred to 10-ml conical glass tubes and subjected to sonication for 10 min on ice with a Vibra cell ultrasonifier (10% of maximum amplitude; 5-s pulse intervals). The lysate was centrifuged for 10 min at 15,000  $\times$  g to remove cell debris and then supplemented with 10 mM spermine (Sigma-Aldrich) and further centrifuged for 20 min at 290,000  $\times$  g with an Optima TL ultracentrifuge (Beckman Instruments). The supernatant fraction was then extensively dialyzed

against 2 mM phosphate buffer (pH 7.5) in a dialysis cassette with a 10,000-M<sub>w</sub> cutoff (Slide-A-Lyser; Pierce). Samples were stored at -20°C until needed.

**2D-PAGE.** Protein samples were analyzed according to the 2D polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) method described by Görg et al. (11). Samples (250  $\mu$ g) were adjusted to 9 M urea, 2% (wt/vol) 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.32% (vol/vol) Pharmalytes (pH 3 to 10) or 2% (vol/vol) immobilized pH gradient buffer of the appropriate pH range, 0.02% (wt/vol) bromophenol blue, and 0.15% (wt/vol) dithiothreitol in a total volume of 0.45 ml and then applied to 18-cm dry gel strips carrying an immobilized pH gradient (Amersham Biosciences). Strips were allowed to rehydrate with sample solutions for at least 6 h at room temperature. Linear pH gradient gels in the 4 to 7 range were generally employed, but occasionally a narrower pH gradient in the 4.5 to 5.5 range was used.

Isoelectric focusing was carried out in a Multiphor II electrophoresis unit connected to a Multidrive XL power supply (Amersham Biosciences). Voltage was increased stepwise from 150 to 3,500 V over 5 h and held at this value for at least 12 h, resulting in a minimum of 44,000 V  $\cdot$  h. Gel strips were subsequently incubated for 30 min in 5 ml of equilibration buffer (6 M urea, 50 mM Tris-HCl [pH 8.8], 30% glycerol, 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 16 mM dithiothreitol, 0.01% bromophenol blue) and applied on top of a 12.5% polyacrylamide gel. Second-dimension electrophoresis was carried out in a Protean II xi cell (Bio-Rad) at 40 mA for 4 to 5 h by using a standard Tris-glycine buffer system. Occasionally, the second dimension was performed in a Tris-Tricine buffer system (36). The proteins were visualized by silver staining or Coomassie blue staining. Gels were scanned wet with an Agfa scanner (model Duoscan T1200) and subsequently dried between cellophane sheets with an air drier (Easy Breeze gel dryer; Amersham Biosciences).

**Determination of N-terminal and internal peptide sequences.** For protein sequence analysis of selected spots, 2D gels were loaded with a sample containing between 0.6 and 0.9 mg of protein. After the second dimension, the gel was transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Problott; Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) by semidry electroblotting (30 min at 170 mA) in 10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic buffer (pH 9.5) containing 10% methanol. After protein staining with Coomassie blue, spots of interest were

excised from the polyvinylidene difluoride membrane and then subjected to automated Edman degradation on an Applied Biosystems sequencer.

For peptide sequencing by tandem mass spectrometry (MS/MS), protein spots of interest were cut out from Coomassie blue-stained 2D gels and then subjected to in-gel trypsin digestion as previously described (9). Each gel band was then extracted with 5% (vol/vol) formic acid solution and acetonitrile. Extracts were combined and evaporated to dryness. The residues were dissolved in 0.1% (vol/vol) formic acid and desalted with a Zip Tip (Millipore, Bedford, Mass.). Elution of the peptides was performed with 5  $\mu$ l of a 50:50:0.1 (vol/vol) acetonitrile-H<sub>2</sub>O-formic acid solution. The peptide solution was introduced into a glass capillary (MDS Protana, Odense, Denmark) for nano-electrospray ionization. MS/MS experiments were carried out on a quadrupole time of flight hybrid mass spectrometer (Micromass, Manchester, United Kingdom). Collision-induced dissociation of selected precursor ions was performed by using argon as the collision gas and with collision energies of 40 to 60 eV. Interpretation of MS/MS spectra was achieved manually and with the help of the PepSeq program (MassLynx software; Micromass). Data obtained from N-terminal and MS/MS sequence analyses were used for homology searches in the databases with the use of the BLAST facility (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) or the FASTA program (33).

**In vivo <sup>35</sup>S-labeling of proteins.** Acetate-grown cultures of *Mycobacterium* were harvested in mid-log phase and resuspended to an OD<sub>600</sub> of 2.0 in MSM. Portions of this suspension (25 ml) were transferred to 100-ml flasks containing one of the following carbon sources: pyrene (5 mg), phenanthrene (25 mg), benzoate (5 mM), acetate (25 mM), or none. PAHs were supplied as 5-ml solutions in silicone oil. After 1 h of incubation at 25°C, bacterial suspensions were supplemented with 0.14 mCi (5.18 MBq) of a <sup>35</sup>S-labeled mixture of methionine and cysteine (Easytag Express protein-labeling mix; NEN Life Science Products) combined with a mix of the two nonlabeled amino acids as carriers (12  $\mu$ M Met plus 6  $\mu$ M Cys). Bacteria were further incubated for variable time periods depending on the carbon source added: 6 h (benzoate and acetate), 17 h (phenanthrene), or 32 h (pyrene and no carbon source added). Then cells were harvested by centrifugation, washed once in MSM, and resuspended in 0.25 ml of 0.1 M Tris-HCl–10 mM EDTA (pH 8.0). Bacterial extracts were prepared as described above and analyzed by 2D-PAGE (375- $\mu$ g protein samples were used). Gels were stained with Coomassie blue, dried, and exposed to X-ray films for 4 days (Hyperfilm- $\beta$ max; Amersham Biosciences).

**General DNA manipulations.** Restriction enzyme digestions, ligations, and agarose gel electrophoresis were performed by using standard procedures (35). DNA fragments were purified from agarose gels by using a Jetquick gel extraction spin kit (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen, Germany). *Mycobacterium* DNA was isolated by using the following method adapted from that of Gonzalez-Merchand et al. (10). Benzoate-grown cells (from 2.8 liters of culture) were harvested in mid-log phase, resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 1 mM EDTA), and treated with 10 mg of lysozyme/ml at 37°C for 30 min. The suspension was adjusted to 1% SDS and subjected to three freeze-thaw cycles consisting of a freezing step with liquid nitrogen followed by heating at 65°C for 10 min. Cetyltrimethylammonium bromide (11.3 g/liter) was added to facilitate the removal of polysaccharides and proteins during two chloroform-isoamyl alcohol extraction steps. Two more phenol-chloroform-isoamyl alcohol extractions were then performed before the precipitation of nucleic acids with isopropanol. DNA was washed in 70% ethanol and dissolved in TE buffer.

For Southern hybridization experiments, DNA fragments used as probes were labeled with digoxigenin by using a random prime labeling kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). *Mycobacterium* genomic DNA samples (1 to 2  $\mu$ g) were digested to completion with restriction endonucleases *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Bam*HI, *Pst*I, and *Sma*I and then analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel. The DNA fragments were denatured with NaOH and transferred by Southern blotting onto nylon membrane (Biodyne; Pall Life Sciences, Saint-Germain-Laye, France). The membrane was prehybridized for 1 h and then hybridized overnight at 65°C. Posthybridization washings and detection were performed according to the protocol of the supplier (Roche Diagnostics).

**Construction of a genomic library.** Genomic DNA from *Mycobacterium* sp. strain 6PY1 was digested with restriction enzyme *Bam*HI, and the fragments obtained were cloned into predigested ZAP Express vector according to the supplier's instructions (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands). The ligated DNA was packaged by using the Gigapack III gold packaging extract (Stratagene) and propagated as recombinant phages in *E. coli* XL1-Blue MRF'. Clones of *E. coli* containing corresponding phagemids were transferred to 96-well microtiter plates to facilitate screening of the library.

**Cloning of the genes encoding dioxygenase components Pdo1 and Pdo2 from strain 6PY1.** Two degenerate primers (K7-F, 5'-CARACSGARACSGA-3', and ISP $\alpha$ 1-R, 5'-CCASCRTGRTASSWRCA-3') were designed based on

the N-terminal sequence of protein P10 and an internal consensus sequence (CSYHGW) found in most dioxygenase  $\alpha$  subunits. With these two primers, a 372-bp DNA fragment was amplified by PCR with *Mycobacterium* DNA as the template. This fragment was cloned into *E. coli* by using the pCR2.1 cloning kit (Invitrogen), resulting in plasmid pSK-B3, and its sequence was determined. The genes encoding Pdo1 were amplified by PCR by using strain 6PY1 genomic DNA as the template and the Expand High-Fidelity DNA polymerase (Roche Diagnostics). The following primers were employed: pdoA1-F (5'-GGCATATGCAAACGGAACGACCGA) and pdoA1-R (5'-GGGATATCTCAAGCACGCCGCCGAATG) for *pdoA1* and pdoB1-F (5'-GGCATATGAACGCCGTTGCCGTGGA) and pdoB1-R (5'-GGGGATCCTACAGGACTACCGACAG) for *pdoB1* (underlined sequences denote restriction sites for *Nde*I, *Eco*RV, and *Bam*HI). Primer pdoA1-F was designed after the 5' end of the 372-bp DNA fragment described above. The other primers were designed after the nucleotide sequences of *nidA* (accession number AF249301) and *nidB* (accession number AF249302) from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. PCR products were ligated into pPCR-Script, giving pSKU03 (*pdoA1*) and pSKU04 (*pdoB1*). The DNA sequences of the inserts on both strands were determined. The genes encoding Pdo2 were cloned as follows. A PCR amplification with 6PY1 genomic DNA and two degenerate primers, P3-F (5'-ATGGTNGCNACNGTNGARCA) and P3-R (5'-TCYTCNGCCANGCRTAYTC), generated a 270-bp fragment which was cloned and sequenced. The same primers were then used to screen the genomic library in ZAP Express by PCR amplification of clones. For this purpose, serial rounds of PCR were carried out on groups of 96, and then of 12, clones, each round consisting of cell lysis by boiling of the colonies in water for 5 min at 95°C, centrifugation, and PCR with 2  $\mu$ l of supernatant and 10  $\mu$ l of a mix containing deoxynucleoside triphosphate, primers, and *Taq* polymerase (Promega). One positive clone was selected, which contained a phagemid with a 2.3-kb insert (pSKU07). The sequence of the insert was determined. A 1.2-kb DNA fragment containing the 3' end of *pdoB2* was generated by PCR by using genomic DNA as a template and primers P3-F and Redcons1-R (5'-TTGGAYAGWGGCGWCGBTCRTAWGG). The first primer corresponds to the 5' end of *pdoB2*, whereas the second primer was designed after a consensus sequence (PYERPPLSK) found upon alignment of reductase components of representative ring-hydroxylating dioxygenases. The 1.2-kb fragment was cloned into pGEM-T Easy to give pSKU10 and sequenced. DNA sequence analyses as well as protein sequence comparison and alignment were performed by using programs available on the Infobiogen server (<http://www.infobiogen.fr/services/deambulum/fr/index.html>).

**Construction of plasmids for protein overexpression.** *pdoB1* was isolated from pSKU04 by digestion with *Nde*I and *Bam*HI and then ligated into pET9a to give pSKU05. This plasmid was digested with *Xba*I, treated with the Klenow enzyme to generate a blunt-ended product, and further digested with *Bam*HI to generate a 0.6-kb DNA fragment carrying the *pdoB1* coding sequence preceded by an efficient ribosome-binding site. This fragment, as well as an *Nde*I-*Eco*RV fragment from pSKU03 carrying *pdoA1*, were ligated between the *Nde*I and *Bam*HI sites of pET9a to give pSKU06. The resulting plasmid contained the *pdoA1* and *pdoB1* genes (in that order) located downstream of a T7 promoter, with each gene preceded by a ribosome-binding site sequence optimal for expression in *E. coli*.

A fragment encompassing the *pdoA2B2* gene sequence was amplified as described above by using primers pdoA2-F (5'-GGCATATGTCTACTGTGCGGT AAGAA) and pdoB2-R (5'-GGAGATCTTAGAAGAAGTTAGCCAG). The underlined sequences denote *Nde*I and *Bgl*II sites introduced to facilitate subcloning. The PCR product was cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) to give pSKU08 and subjected to DNA sequencing to ensure that no error occurred during PCR amplification. The insert of plasmid pSKU08 was isolated by digestion with *Nde*I and *Bgl*II and ligated into pET9a to give pSKU09.

A 1.5-kb DNA fragment carrying the *phdC* and *phdD* coding sequences was amplified by PCR by using the Expand High-Fidelity DNA polymerase, plasmid pHA171 as a template, and primers phdCeco (5'-GGAATTCAGGAGATATACATATGCGTGTG) and phdDxba (5'-CTCTAGACTCATGCCGTGGTAC). The resulting product was treated with an A-addition kit (Qiagen) and cloned into pDRIVE to give plasmid pDRCD. The insert was verified by DNA sequencing and then isolated as an *Eco*RI-*Xba*I fragment and cloned into the corresponding sites of pBBR1MCS-5, which gave plasmid pBRCD.

Plasmids pSKU06, pSKU09, and pBRCD were introduced into *E. coli* strains BL21(DE3)(pLysS) and BL21AI by transformation.

**Overexpression and purification of the recombinant Pdo2 dioxygenase component.** *E. coli* BL21(DE3)(pLysS)(pSKU09) was grown in LB medium containing kanamycin (20  $\mu$ g/ml) and chloramphenicol (33  $\mu$ g/ml) to an OD<sub>600</sub> of ~0.6 and then subjected to induction with 0.1 mM IPTG. After a 3-h incubation at



25°C, the cells were harvested by centrifugation and stored at -20°C until needed. The cells were disrupted by sonication (10% of maximum amplitude; 5-s pulse intervals) for 5 min at 4°C in sonication buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM EDTA, 5% [vol/vol] ethanol). After centrifugation of the cell extract for 10 min at 10,000 × g, the supernatant fraction was diluted with the same volume of buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5% [vol/vol] ethanol, 5% [wt/vol] glycerol) before being applied to a 30-ml DEAE-cellulose column (DE52; Whatman) equilibrated with buffer A. After the column was washed with the same buffer, a brown fraction was eluted with buffer A containing 250 mM NaCl. The brown fraction was adjusted to 1 M ammonium sulfate and applied to a 20-ml phenyl-Sepharose column (Amersham Biosciences). The column was developed with a linear gradient from 1 to 0 M ammonium sulfate in buffer A by using a fast protein liquid chromatography system (Bio-Tek Kontron Instruments, St. Quentin en Yvelines, France). The brown fraction was dialyzed against buffer A and then loaded onto a 1.7-ml column (Optima 5/10 Q-HyperD 10; Biosepra SA, Villeneuve-la-Garenne, France). The column was developed with a linear gradient from 0 to 250 mM NaCl in buffer A. The purified protein was stored frozen in liquid nitrogen.

**Overexpression of the Pdo1 component and purification of the  $\alpha$  subunit.** Expression of Pdo1 in *E. coli* BL21(DE3)(pLysS)(pSKU06) was carried out under conditions similar to those described above, except that recombinant cells were induced with 50  $\mu$ M IPTG at 15°C for 16 h. The cells were disrupted by sonication (same conditions as described above), and the crude extract was centrifuged for 10 min at 10,000 × g to recover the insoluble fraction. This fraction was solubilized in 40 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 8 M urea and then centrifuged for 10 min at 10,000 × g. This sample was diluted by half in H<sub>2</sub>O and applied to a 20-ml column of DEAE-Trisacryl LS (Biosepra SA) equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 4 M urea (buffer B). The column was developed with a linear gradient from 0 to 0.5 M NaCl in buffer B. Fractions containing a prominent 52-kDa band were pooled and concentrated. The 52-kDa protein was further purified by preparative SDS-PAGE and then eluted from gel slices by using an electroeluter (model 422; Bio-Rad SA). The purified preparation was used to raise rabbit polyclonal antibodies against the Pdo1  $\alpha$  subunit, according to the standard protocol of the supplier (Eurogentec). Antibodies against the Pdo2  $\alpha$  subunit were obtained under similar conditions.

**In vivo assays of recombinant Pdo1 and Pdo2 activity.** The PAH dioxygenase activity of recombinant *E. coli* cells expressing Pdo1 or Pdo2 was assayed as follows. Cells were grown in LB medium to an OD<sub>600</sub> of 1.0 and then incubated overnight at 25°C with 0.5 mM IPTG and/or 0.2% DL-arabinose, depending on the strain. Cells were harvested, resuspended in the same volume of M9 minimal medium, and incubated with one-fourth (by volume) of the silicone oil containing 0.1 g of either pyrene or phenanthrene/liter. At various time intervals, samples (0.5 to 1.0 ml) of the upper layer emulsion were withdrawn and briefly centrifuged. The oil phase was extracted with acetonitrile, and the absorbance of the extract was recorded in the 200-to-350 nm range. Amounts of residual pyrene and phenanthrene were calculated from absorption readings at 240 and 252 nm, respectively. Hydrosoluble products were analyzed in 5-ml samples of the aqueous phase, which were centrifuged and then passed through solid-phase extraction columns (Upti-clean C18U, 0.5 g; Interchim, Montluçon, France). Columns were washed with 10 ml of water and then eluted with 1 ml of methanol. Extracts were evaporated under vacuum conditions and stored dry until ready to be analyzed by gas chromatography (GC)-MS. Prior to analysis, extracts were derivatized either with bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide:trimethylchlorosilane (99:1) or with *n*-butylboronate (NBB), both reagents from Supelco (Sigma-Aldrich), according to the manufacturer's instructions. GC-MS analysis was carried out on a HP6890/HP5973 apparatus (Agilent Technologies, Les Ulis, France) equipped with an MDN-12 fused silica capillary column (30 m, 0.25-mm internal diameter, 0.25- $\mu$ m film; Supelco). The oven temperature was held at 75°C for 3 min and then increased to 250°C at 12°C/min, held at this temperature for 1 min, and then increased to 300°C at 10°C/min, with a final hold time of 10 min. The injector was used in the split mode, with a split ratio of 50:1 and an injection volume of 2.5  $\mu$ l. Mass detection was carried out in the selected ion monitoring mode for quantification and in the total ion current mode for determination of the mass spectra of diols and their derivatives. The solvent delay prior to data acquisition was 5.5 min for trimethylsilyl (TMS) derivatives and 11 min for NBB derivatives.

The TMS derivatives of phenanthrene and pyrene dihydrodiols were quantified by using purified phenanthrene *cis*-9,10-dihydrodiol and pyrene *cis*-4,5-dihydrodiol as standards (Willison, unpublished). GC-MS peak areas were proportional to sample concentration when the selected ion monitoring mode of detection was used, with the selected ions having *m/z* values of 290 for the TMS derivative of pyrene dihydrodiol and 178, 266, and 356 for the TMS derivative of phenanthrene dihydrodiol. Phenanthrene *cis*-3,4-dihydrodiol was provisionally

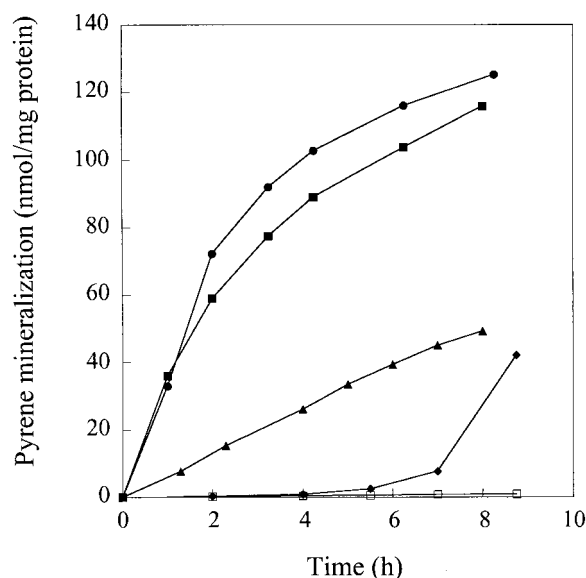


FIG. 2. Time course of [<sup>14</sup>C]pyrene mineralization by *Mycobacterium* strain 6PY1 grown on different C sources. Bacteria were incubated with [<sup>14</sup>C]pyrene in closed flasks as described in Materials and Methods. The <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> that evolved was continuously trapped in sodium hydroxide and quantified at the times indicated. Results shown are the means of results from duplicate experiments and are expressed as the amount of cumulated pyrene mineralization normalized to the protein concentration of the bacterial samples. Bacteria were grown on either pyrene (■), phenanthrene (●), benzoate (▲), or acetate (◆). Acetate-grown cells were also incubated with chloramphenicol (□). The extent of pyrene mineralization at the end of the experiment was 38.9, 44.5, 17.8, and 17.2% for cells grown on pyrene, phenanthrene, benzoate, and acetate, respectively.

identified on the basis of the mass spectra of the underivatized and derivatized compounds and its longer GC retention time with respect to the 9,10-isomer (32).

**Other analytical methods.** Whole-cell protein content was determined according to the method of Lowry et al. (29) after bacterial samples were subjected to 0.2 M NaOH for 1 h at 90°C. Routine protein assays were done with the bicinchoninic acid reagent kit (Pierce) by using bovine serum albumin as a standard. SDS-PAGE on mini slab gels and Western blot analysis were performed as previously described (18). Rabbit serum antibodies and secondary goat anti-rabbit immunoglobulin G coupled to peroxidase (Sigma-Aldrich) were used at a 1:5,000 dilution.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The nucleotide sequences described in this report have been deposited in the DDBJ, EMBL, and GenBank databases under accession numbers AJ494743, AJ494744, and AJ494745.

## RESULTS

**Induction of pyrene mineralization in *Mycobacterium* strain 6PY1.** In addition to pyrene, strain 6PY1 can grow with acetate, benzoate, and phenanthrene as alternative carbon sources. The abilities of bacterial cells grown on each of these substrates to mineralize [<sup>14</sup>C]pyrene were compared (Fig. 2). Pyrene- and phenanthrene-grown cells showed similar activities, with initial mineralization rates around 36 nmol/h/mg of protein. Benzoate-grown cells displayed about fivefold less activity than pyrene- and phenanthrene-grown cells, whereas acetate-grown cells had essentially no activity. After a 6-h incubation with pyrene, mineralization became detectable in acetate-grown cells. This activity was dependent on protein synthesis since it did not occur in cells treated with chloramphenicol. These results suggested that the enzymes responsible

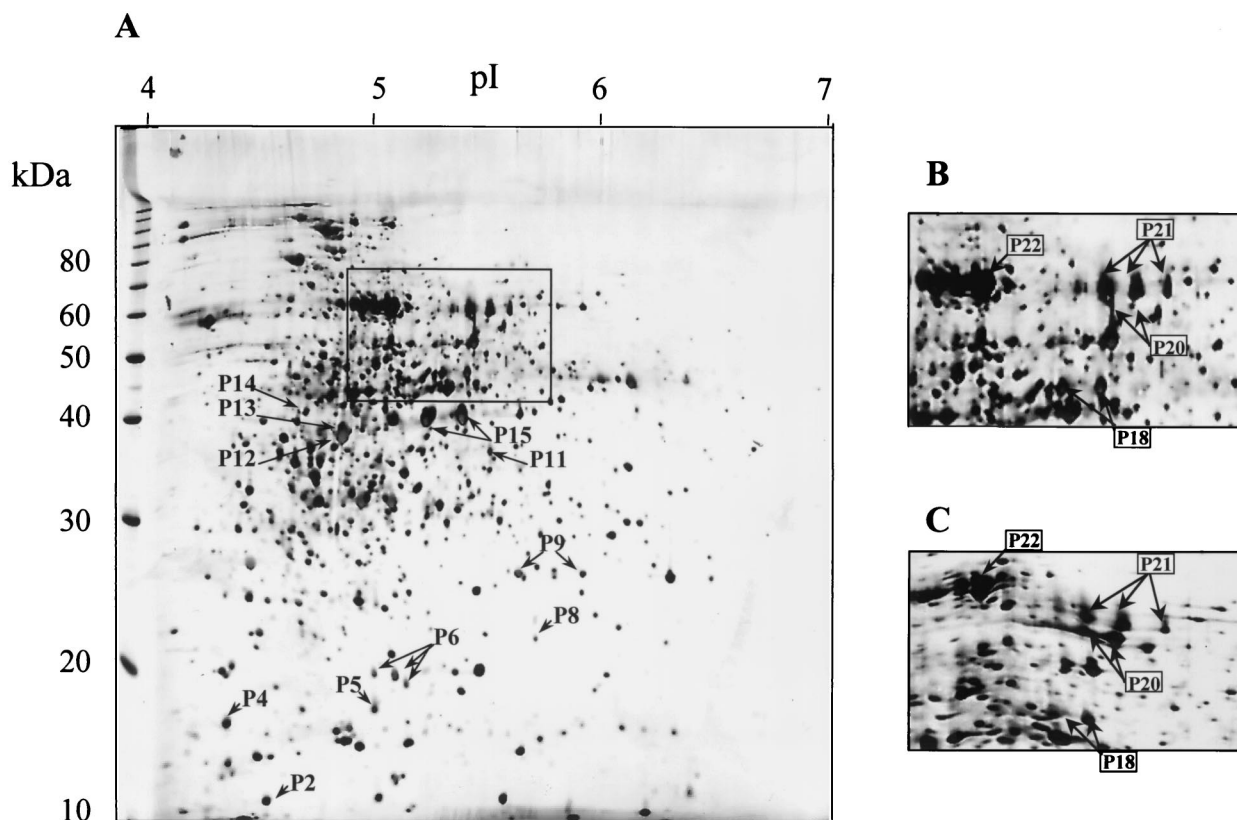


FIG. 3. 2D-PAGE analysis of the soluble extract from strain 6PY1 grown on pyrene. (A) Proteins were separated in a pI gradient from 4 to 7 and then on a 12.5% polyacrylamide gel, after which they were silver stained. The pI and molecular mass (in kilodaltons) ranges are indicated. (B) Enlargement of the boxed area indicated in panel A. (C) Same area of a gel loaded with a similar extract supplemented with purified Pdo2. Polypeptides that were absent in acetate-grown cells are indicated by arrows and numbered as a function of increasing  $M_r$ s. Polypeptides P1, P3, P7, P10, P16, P17, and P19 do not appear in this figure.

for pyrene degradation were not expressed in acetate-grown cells but that intermediate levels of these enzymes might be expected in cells grown on benzoate. As a means of identifying enzymes involved in pyrene degradation, soluble protein extracts from cells grown on pyrene, phenanthrene, acetate, or benzoate were analyzed by 2D-PAGE.

**Protein profiles of pyrene-grown cells compared to those of cells grown on three other C sources.** Preliminary 2D-PAGE analyses of cell-free extracts of strain 6PY1 involving a first-step separation in a pH gradient from 3 to 10 indicated that most soluble polypeptides had isoelectric points (pIs) ranging between 4 and 7. For the comparative analysis of proteins from cells grown on four C sources, we therefore performed isoelectrofocusing of polypeptides in the pH 4 to 7 range and further separated those in the 10- to 100-kDa range on 12.5% polyacrylamide gels. Visual inspection of silver-stained protein patterns revealed that 21 protein spots found in pyrene-grown cells were absent in acetate-grown cells (Fig. 3). At least 12 of these polypeptides appeared as major components of the cell extract, as judged from their polypeptide spot size. As revealed by subsequent peptide sequence analysis (see below), many of the peptides of interest (P6, P9, P15, P18, and P21) gave rise to a doublet or triplet of spots with similar  $M_r$ s and slightly different pIs. Some other polypeptides were poorly resolved due to very close  $M_r$ s and pIs, as was the case for polypeptides

P12 and P13. Further analysis revealed the occurrence of two additional pyrene-specific polypeptides, named P1 and P20, which passed undetected on regular 2D gels, as shown in Fig. 3A. Because of its small size, P1 ( $M_r = 10,900$ ; pI 4.6) was best detected on 2D gels run in a Tris-Tricine buffer system in the second dimension as described in Materials and Methods (data not shown). Peptide P20, which was later identified as a dioxygenase  $\alpha$  subunit (Pdo2 $\alpha$ ; see below), appeared as a minor peptide found very close to the triplet of spots generated by P21 (Fig. 3B). P20 was unambiguously identified as the  $\alpha$  subunit of Pdo2 upon 2D-PAGE analysis of a 6PY1 extract from pyrene-grown cells supplemented with purified Pdo2 (Fig. 3C). At this stage of our comparative 2D-PAGE analysis, a total of 16 distinct polypeptides appeared to be specifically synthesized in pyrene-grown cells of strain 6PY1 (Fig. 3). Most of the selected polypeptides were also found in phenanthrene-grown cells, but five proteins were missing in benzoate-grown cells (designated P4, P5, P8, P14, and P20).

As an alternate method to detect pyrene-specific polypeptides, we performed metabolic labeling of whole-cell proteins, taking advantage of the fact that pyrene-degrading enzymes were apparently inducible in strain 6PY1 upon incubation with PAHs (Fig. 2). For this purpose, bacteria grown on acetate were washed and resuspended in MSM containing a mixture of [ $^{35}$ S]methionine and cysteine and either pyrene, phenanthrene,

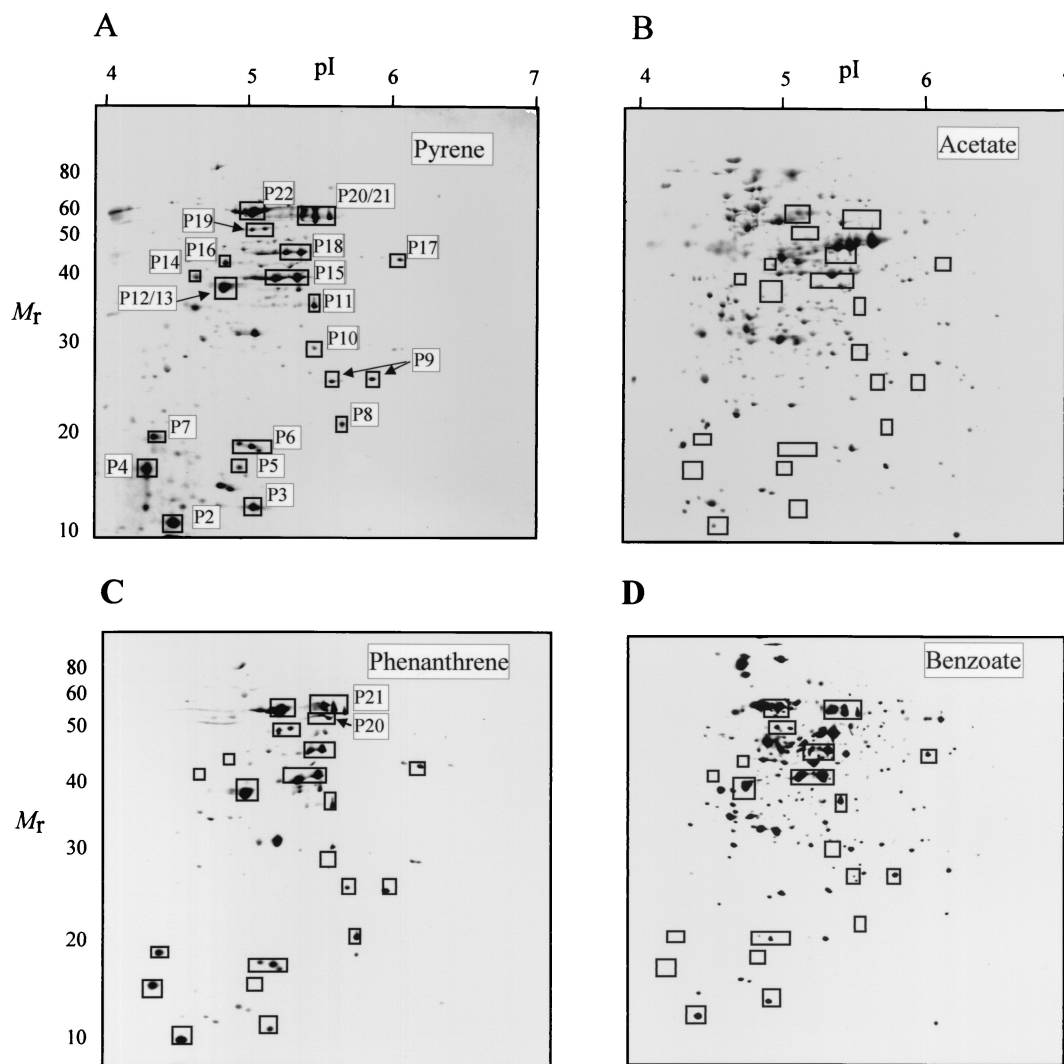


FIG. 4. 2D-PAGE analysis of  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins induced upon incubation of strain 6PY1 with pyrene or other carbon sources. Acetate-grown cells were incubated with either pyrene, phenanthrene, benzoate, or acetate in the presence of  $^{35}\text{S}$ -labeled amino acids as described in Materials and Methods. Labeled proteins were then analyzed by 2D-PAGE and autoradiography. Boxed protein spots were not detected in control cells incubated with no carbon source or with acetate. Proteins P21 and P6 represent the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of Pdo1, and P20 and P8 represent the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of Pdo2.

benzoate, or acetate as carbon sources. Proteins which incorporated radioactivity were subsequently analyzed by 2D-PAGE and autoradiography (Fig. 4). Analysis of cells exposed to pyrene revealed a relatively small number of labeled polypeptide spots (around 40), 31 of which were undetectable in control cells incubated without any carbon source (data not shown) or in cells exposed to acetate (Fig. 4B). The selected set of polypeptides included all those previously found to be missing in acetate-grown cells relative to pyrene-grown cells when steady-state levels of the proteins were compared (Fig. 3). The additional peptides detected by protein labeling, designated P3, P7, P10, P16, P17, and P19, were relatively minor components and either hardly detectable by silver staining or masked by neighboring spots in crowded regions of the 2D gel. Among those polypeptides, three were undetectable in benzoate-induced cells (P7, P10, and P16), two of which (P10 and P16) were also absent in phenanthrene-induced cells (Fig. 4C and D).

**Identification of selected pyrene-induced proteins by peptide sequencing.** Eleven polypeptides chosen among the 22 pyrene-induced polypeptides detected in strain 6PY1 were subjected to amino acid sequencing, either by N-terminal or internal peptide analysis (Table 2). Three polypeptides (P9, P15, and P18) gave pairs of spots with identical N termini, the same  $M_r$ s, and different pIs, whereas two polypeptides yielded triplets (P6 and P21). In such cases, each pair or triplet was assumed to result from some minor posttranslational modification of a single polypeptide. A database search for proteins showing similarities with the available N-terminal sequences yielded a significant match in five cases. Polypeptides P1, P15, and P22 showed high similarity with the ORF131, PhdG, and PhdH products found in the phenanthrene-degrading marine bacterium *Nocardioides* sp. strain KP7 (34). PhdG and PhdH have been identified as a hydratase-aldolase and an aldehyde dehydrogenase, respectively. The N terminus of protein P6



TABLE 2. Sequence analysis of pyrene-induced polypeptides from 6PY1 and possible functions based on sequence similarities

Polypeptide ( $M_r$ )	N terminus or internal peptide sequence(s) <sup>a</sup>	Best database match <sup>b</sup>	% Amino acid identity <sup>c</sup>	Possible function
P1 (10.9)	<i>AIRFLTDDWATAVDAANADERF(R)IAAKGH</i>	ORF131 (AB031319)	70	Unknown
P6 (19.0)	<i>N[AM][NV]AVDRD(R)(R)E</i>	NidB (AF249302)	99	$\beta$ Subunit of arene dioxygenase
P8 (21.0)	<i>VATVEQQLLLRCE(M)E</i> <b>XEYAWAED</b>	PhdB (AB031319) Residues 85–91	62	$\beta$ Subunit of arene dioxygenase
P9 (25.4)	<i>TVDDQRTGRPMA</i>	None		Unknown
P12 (37.0)	<b>[L/I]YADAG[L/I]DXXXKET[L/I]AY</b> <b>CR</b>	ThtR (O05793) Residues 217–234	89	Thiosulfate sulfur transferase
P13 (37.2)	<i>ARDDKLTSDDITGV</i> <b>[I/L]GELGADGLFVGR</b> <b>AA[L/I][K/Q][K/Q]R</b> <b>H[L/I]G[L/I][L/I]SGSAES. . [L/I]R</b> <b>XX[L/I]Q[L/I]DNA[K/Q]F[K/Q]AA</b>	PhdJ (D89988) Residues 111–120 Residues 194–199 Residues 179–192 Residues 278–288	58	<i>trans</i> -2'-Carboxylbenzalpyruvate hydratase-aldolase
P15 (39.0)	<i>TTTSSSELVPSDMKGLTGFVPA(A)STP</i>	PhdG (AB031319)	72	Hydratase-aldolase
P16 (42.7)	<i>MRAALAMKVGGKFEI</i>	None		Unknown
P18 (45.4)	<i>STAEISGLTEF</i> <b>MAG[L/I]AGSPYDVVG[L/I]R</b> <b>NALLFSVTLOPTLK</b>	PhdI (AB000735) Residues 239–253 Residues 333–346	40	1-Hydroxy-2-naphthoate dioxygenase
P21 (54.0)	<i>QTETTEX(A)</i>	NidA (AF249301)	98.5	$\alpha$ Subunit of arene dioxygenase
P22 (58.0)	<i>MINANLIIDGREETSDDRTIDV</i>	PhdH (AB031319)	90	Aldehyde dehydrogenase

<sup>a</sup> Bold letters indicate residues that are identical between relevant peptides and best database matches. Italicized letters indicate N-terminal sequences. Letters in parentheses represent uncertain residues; those in brackets represent residues that are equally possible at that position. X, undetermined residue.

<sup>b</sup> Accession numbers are indicated in parentheses. Other numbers indicate positions in the sequences of the protein homologues which best match relevant peptide sequences.

<sup>c</sup> Calculated from available peptide sequences. Proteins P6 and P21, the sequences of which were deduced from the *pdoA1* and *pdoB1* gene sequences, were compared to the *nidB* and *nidA* gene products, respectively, on the basis of the entire sequences.

closely matched the corresponding region of the *nidB* gene product from *Mycobacterium* strain PYR-1 which has been recently described as the  $\beta$  subunit of a ring-hydroxylating dioxygenase (24). Protein P21 gave a triplet of spots, none of which yielded more than six residues by N-terminal sequencing. Nevertheless, a significant match was found with the  $\alpha$  subunit of benzene dioxygenase and the *nidA* gene product from strain PYR-1. Gene sequencing later revealed that protein P21 was associated with protein P6 to form a ring-hydroxylating dioxygenase (see below).

Proteins P8, P13, and P18, for which N-terminal sequence analysis was inconclusive, were subjected to MS/MS to determine the sequences of internal tryptic peptides. Protein P8 yielded a heptapeptide, EYAWAED, corresponding to a partially conserved region found in  $\beta$  subunits of ring-hydroxylating dioxygenases. This finding suggested the presence of a second arene dioxygenase in strain 6PY1, which we later confirmed by identifying the corresponding genes and isolating the protein (see below). Sequences of four peptides from protein P13 were determined, and all matched internal regions of a single protein characterized as a *trans*-2'-carboxylbenzalpyruvate hydratase-aldolase encoded by *phdJ* in *Nocardioideis* strain KP7 (34). In addition, protein P13 ( $M_r$ , 37,200) was similar in size to the enzyme from strain KP7 (38 kDa). A database search for proteins with similarities to protein P18 with the use of available peptide sequences did not give significant results.

However, we observed that two internal peptides from this protein (Table 2) exhibited some sequence similarity to internal regions of the 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase (PhdI) from strain KP7 (17). Moreover, the molecular properties of protein P18 ( $M_r$ , 45,000; pI 5.15) were very close to those deduced from the PhdI protein sequence (molecular mass, 43,076 Da; pI 5.01 to 5.23, depending on software). On the basis of available information, it seems reasonable to propose that protein P18 is a 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase analogous to the PhdI protein from strain KP7. Protein P12 was hardly resolved from peptide P13 by 2D-PAGE, even when the proteins were isofocused in a 1-U pH range. Nevertheless, we could separate the two protein spots well enough for sequence analysis upon prolonged electrophoresis in the second dimension. An 18-residue-long tryptic peptide from protein P12 was sequenced by MS/MS and found to perfectly match an internal region of the ThtR protein from *Mycobacterium tuberculosis* (accession number O05793). ThtR was described as a putative thiosulfate sulfur transferase based on sequence similarities to rhodanese, a ubiquitous enzyme that might be involved in Fe-S cluster assembly (5). Should protein P12 also be a sulfur transferase, its possible role in the catabolism of aromatic hydrocarbons in strain 6PY1 remains elusive.

Further comparison of 2D gel patterns revealed that four polypeptides found in extracts from phenanthrene-grown cells were either absent or much less abundant under other culture

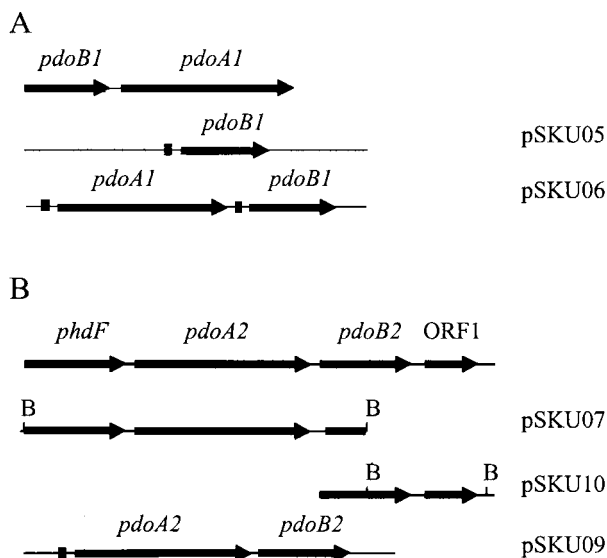


FIG. 5. Maps representing the two loci containing the dioxygenase-encoding genes from *Mycobacterium* sp. strain 6PY1. Plasmids used for overexpression of *pdoA1B1* (A) and *pdoA2B2* (B) in *E. coli* are also represented. Black squares indicate ribosome-binding sequences optimal for *E. coli*. B, *Bam*HI.

conditions (data not shown). The N-terminal sequences of those peptides were determined. Searches in the databases yielded a significant match for only one polypeptide, called P23, whose N terminus displayed 60% identity with that of a dihydrodiol dehydrogenase (BphB; accession number D88021) from the biphenyl-degrading strain *Rhodococcus erythropolis* TA421 (25). A 50% sequence identity was also found between the P23 N terminus and that of the *phdE* gene product, another dihydrodiol dehydrogenase thought to be involved in phenanthrene degradation in *Nocardioide*s strain KP7 (34). The apparent molecular characteristics of protein P23 ( $M_r$ , 27,000; pI 5.15) are also consistent with those of many dihydrodiol dehydrogenases, including PhdE (mass, 28,150 Da; pI 5.1).

**Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes encoding two distinct arene dioxygenases.** In order to clone the gene encoding protein P21, a DNA fragment was amplified by PCR from the genomic DNA of *Mycobacterium* strain 6PY1 by using two primers designed from the N terminus of P21 and a consensus sequence (C[P/S]YHGW) found at the iron-sulfur binding site in dioxygenase  $\alpha$  subunits. The resulting 372-bp fragment was sequenced and found to be 98% identical to the 5' end of the *nidA* gene from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 (24). Since protein P6 had an N-terminal sequence closely similar to that of the *nidB* gene product from strain PYR-1, it was likely that proteins P21 and P6 were encoded by genes homologous to the *nid* genes from strain PYR-1. We then used two sets of primers designed after the 5' and 3' ends of *nidA* and *nidB*, respectively, and performed PCR amplification with strain 6PY1 DNA as a template. Two fragments were obtained, cloned, and sequenced. One fragment consisted of a 1,377-bp open reading frame (ORF), potentially coding for a 50,336-Da polypeptide. The second fragment comprised 512 bp and might encode a polypeptide with a predicted molecular mass of 19,502 Da. The N termini of the deduced polypeptides

exactly matched those found for proteins P6 and P21. These genes displayed high similarity with the *nidB* and *nidA* genes from strain PYR-1, and further PCR analysis suggested that they were arranged in the same atypical order, i.e., *nidB* preceded *nidA* (Fig. 5). Unlike the *nidBA* genes from strain PYR-1, the corresponding genes from strain 6PY1 are not inducible by naphthalene, since this strain cannot use this PAH as a growth substrate. They were therefore designated *pdoB1* ( $\beta$  subunit) and *pdoA1* ( $\alpha$  subunit).

The occurrence of a second ring-hydroxylating dioxygenase in strain 6PY1 was anticipated after the identification of protein P8 as a potential  $\beta$  subunit distinct from P6. Degenerate primers designed after the N terminus and the available internal sequence of protein P8 allowed for the amplification of a 270-bp DNA fragment. The deduced partial sequence exhibited significant similarity to known  $\beta$  subunits of dioxygenases. The 270-bp fragment was then used to screen a  $\lambda$  library constructed with strain 6PY1 genomic DNA. A positive clone that carried a 2.3-kb insert was isolated. Sequence analysis revealed that the insert contained two partial ORFs and one complete ORF (Fig. 5). The first ORF (partial sequence) translated into a polypeptide sequence of 189 residues which exhibited 88% identity with an extradiol dioxygenase from *Nocardioide*s strain KP7 (*phdF* gene product) (34). The second ORF comprised 1,401 bp and translated into a 466-residue polypeptide which showed strong similarity with the  $\alpha$  subunit of the phenanthrene dioxygenase from strain KP7 (*phdA* gene product; 73% identity) (34). The sequence of the third ORF, which encodes protein P8, was interrupted at the 3' end of the insert at a *Bam*HI site. A DNA fragment starting at the 5' end of this ORF and extending 1.2 kb downstream was generated by PCR and subjected to sequencing. Thereby, the complete sequence of the gene encoding protein P8 was determined. The deduced polypeptide sequence showed 63% identity with the product of *phdB* which codes for the  $\beta$  subunit of phenanthrene dioxygenase in strain KP7. Hence, a second dioxygenase system was identified in strain 6PY1, encoded by genes designated *pdoA2* and *pdoB2*. Downstream of *pdoB2*, we found an ORF similar in sequence and location to ORF72 in strain KP7. Further downstream, no sequence analogous to a gene present in the *phd* operon of strain KP7 could be identified. In this respect, we were unable to detect a reductase-encoding gene analogous to *phdD* (found 3 kb downstream from *phdB* in strain KP7) by employing several PCR-based strategies in attempts to amplify such a gene downstream of *pdoB2* (data not shown). For instance, a PCR product was obtained by using primers designed to hybridize to *pdoB2* and to a consensus sequence found in several reductases, including PhdD (see Materials and Methods), but surprisingly, no sequence relevant to a reductase was found in this fragment (Fig. 5). Also, attempts were made to detect a potential ferredoxin or reductase gene by subjecting total DNA to Southern hybridization with the *phdC* or *phdD* gene from KP7 as probes, but no specific signal was obtained. Hence, there was no evidence for a gene coding for a ferredoxin or a reductase in the immediate vicinity of *pdoA2B2*.

Digestions of total genomic DNA from strain 6PY1 with six restriction enzymes were analyzed by Southern hybridization by using probes specific for *pdoA1* or *pdoA2*. Results showed a single-band pattern in every case (data not shown), indicating

that each gene was present as a single copy in the genome and that the probes did not detect an additional homologous gene under the conditions used.

**Overexpression and purification of the terminal component of two dioxygenases from strain 6PY1.** To further characterize the two dioxygenase systems found in strain 6PY1, the *pdoA1B1* and *pdoA2B2* pairs of genes were separately cloned in expression vector pET9a and overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3)(pLysS), as described in Materials and Methods. Analysis of crude extracts of IPTG-induced recombinant cells by SDS-PAGE revealed that two polypeptides with  $M_r$ s of about 52,000 and 20,000 were overproduced in both cases (data not shown). Parts of the recombinant polypeptides were pelleted with cell debris upon centrifugation of broken cells, indicating that they formed insoluble inclusion bodies in *E. coli*. When strain BL21AI was used as a host, a greater proportion of the recombinant Pdo1 and Pdo2 proteins was recovered in the soluble fraction, which correlated with the detection of much higher levels of dioxygenase activity in those recombinant cells (see below). The Pdo2 protein could be purified to near homogeneity by using a three-step procedure (see Materials and Methods). The Pdo1 protein appeared to be unstable and lost its brown color at the second step of the purification. Nevertheless, the  $\alpha$  subunit of this protein could be purified under denaturing conditions and was used to raise antibodies for immunoblot studies (see below).

The purified Pdo2 enzyme, encoded by *pdoA2B2*, consisted of two types of subunits, with  $M_r$ s of 52,000 ( $\alpha$  subunit) and 20,000 ( $\beta$  subunit) in accordance with the expected sizes of the *pdoA2* (51.7 kDa) and *pdoB2* (19.8 kDa) gene products, respectively (Fig. 6). It appeared as a red-brown protein fraction which displayed a broad absorption band in the visible range, with a maximum around 456 nm. The absorption coefficient at 456 nm was calculated to be  $10.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , assuming a molecular mass of 215 kDa for an expected  $\alpha_3\beta_3$  hexamer. This value is similar to the values previously reported for the terminal component of other dioxygenases (8, 13). These data are consistent with the presence of one Rieske-type (2Fe-2S) cluster per pair of  $\alpha\beta$  subunits in the recombinant protein.

**Transformation of pyrene and phenanthrene by recombinant Pdo1 and Pdo2 proteins.** Preliminary attempts to detect pyrene or phenanthrene dioxygenase in strain BL21(DE3) (pLysS) carrying pSKU06 or pSKU09 yielded very low activity levels. In contrast, when strain BL21AI was used as a host, significant conversion of the PAH substrates by arabinose-induced cells was observed. Strain BL21AI(pSKU06) transformed pyrene into a hydrosoluble product which was identified as *cis*-4,5-dihydroxy-4,5-dihydropyrene by GC-MS. A quantitative estimation of the diol product indicated that approximately 5% of the substrate was converted within 24 h. Strain BL21AI(pSKU09) also converted pyrene to the same dihydrodiol but at a much slower rate (0.18% of pyrene conversion within 24 h). When phenanthrene was provided as the substrate, two oxidation products were detected in the aqueous supernatant from cultures expressing either Pdo1 or Pdo2. GC-MS analysis of the TMS and NBB derivatives identified those products as 3,4-dihydroxy-3,4-dihydrophenanthrene and 9,10-dihydroxy-9,10-dihydrophenanthrene (Fig. 7A). In strain BL21AI(pSKU06) expressing Pdo1, the 9,10-dihydrodiol was the major product formed during the first 6 h of incubation

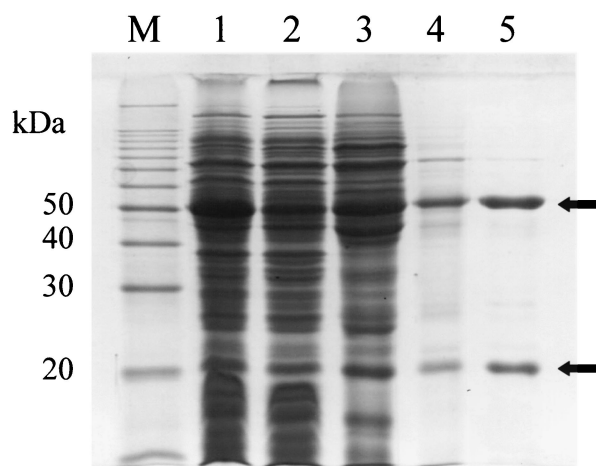


FIG. 6. SDS-PAGE analysis of recombinant Pdo2 during purification from *E. coli*. Lane 1, crude extract; lane 2, soluble fraction; lane 3, DEAE column eluate; lane 4, phenyl-Sepharose column eluate; lane 5, Q-HyperD column eluate; lane M, protein markers. Arrows show the positions of the Pdo2  $\alpha$  and  $\beta$  subunits.

(Table 3) but the 3,4-dihydrodiol became predominant after 24 h (data not shown). On the other hand, strain BL21AI (pSKU09) expressing Pdo2 produced almost exclusively the 3,4-dihydrodiol and only trace amounts of the 9,10-dihydrodiol.

In these experiments, the activities of Pdo1 and Pdo2 measured in recombinant strains were dependent on a source of reductant delivered by the host. As the *E. coli* electron carriers might not be as efficient as those from strain 6PY1 in providing the two dioxygenase terminal components with reductant, the observed activities might have been underestimated. This hypothesis was tested by using strains which coexpressed Pdo1 or Pdo2 together with the reductase and ferredoxin components of the phenanthrene dioxygenase from *Nocardioideis* strain KP7 (Table 3). Expression of *phdC* and *pdhD* from strain KP7 in strain BL21AI(pSKU09)(pBRCD) resulted in a sixfold increase in the rate of phenanthrene dihydrodiol formation and a twofold increase in the rate of pyrene dihydrodiol formation (Table 3). Using this strain, the rate of phenanthrene removal from the medium was shown to follow first-order kinetics (Fig. 7B), and this finding was correlated with a corresponding accumulation of 3,4-dihydrodiol (data not shown). On the other hand, expression of *phdC* and *pdhD* in strain BL21AI (pSKU06)(pBRCD) did not result in a significant increase in Pdo1 activity (Table 3).

**Differential expression of the two dioxygenases in strain 6PY1.** Polyclonal antibodies were raised against the purified large subunits of Pdo1 and Pdo2 and used to detect the presence of each dioxygenase in cell extracts from strain 6PY1. Control immunoblot analysis revealed that the Pdo2 large subunit cross-reacted with the anti-Pdo1 $\alpha$  antibodies but that the Pdo1 subunit did not cross-react with anti-Pdo2 $\alpha$ . Western blot analysis of strain 6PY1 cell protein extracts prepared from cultures grown with four different C sources indicated that Pdo1 was produced provided that bacteria were supplied with an aromatic compound but that it was undetectable in acetate-grown cells (Fig. 8A). In addition, a faint band that had the same mobility as Pdo2 $\alpha$  was detected in the pyrene and phen-

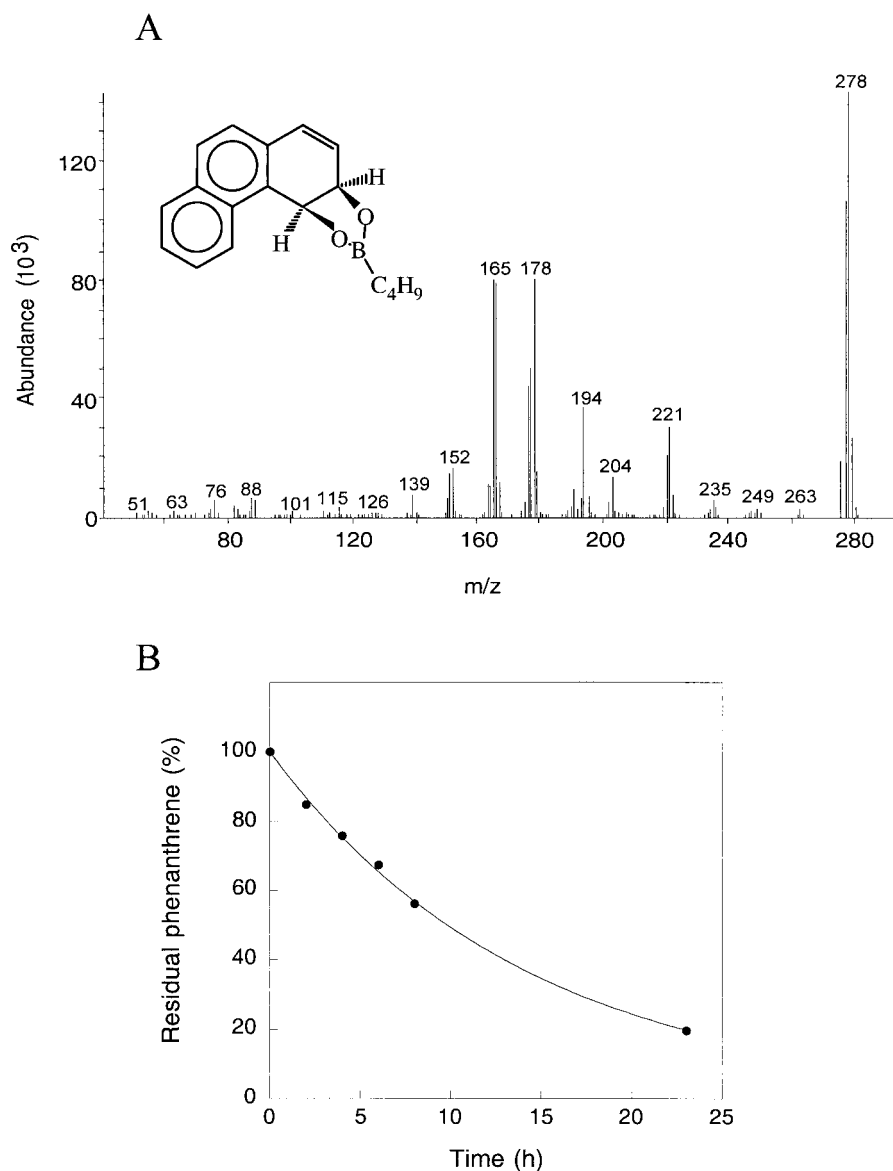


FIG. 7. Phenanthrene transformation by recombinant strains of *E. coli* overproducing Pdo2. (A) Mass spectrum and proposed structure of the major oxidation product, phenanthrene *cis*-3,4-dihydrodiol, recovered from a culture of strain BL21AI(pSKU09) incubated with phenanthrene. The diol product was derivatized with NBB. (B) Time course of phenanthrene transformation by strain BL21AI(pSKU09)(pBRCD) coexpressing *pdoA2B2* and *phdCD*.

anthrene extracts. Analysis of the same protein extracts with anti-Pdo2 $\alpha$  antibodies revealed that the Pdo2 enzyme was detectable only in PAH-grown cells (Fig. 8B). These findings indicated that Pdo1 synthesis was induced by a single-ring aromatic compound or a PAH but that the Pdo2 biosynthesis required the presence of a PAH. This result is consistent with the results of 2D gel analyses, showing that Pdo1 was detectable in cells induced with each of the three aromatic substrates but that Pdo2 was detectable only in PAH-induced cells (Fig. 4).

## DISCUSSION

In this study, proteins involved in pyrene degradation were thoroughly investigated by using a combination of *in vivo* pro-

tein-labeling experiments and 2D-PAGE analyses. This approach led to the identification of a relatively limited number of pyrene-specific polypeptides, most of which were also detected upon induction with phenanthrene. This finding suggests that the same enzymes are involved in the catabolism of the two PAHs. Accordingly, phenanthrene-grown cells were found to be as active as pyrene-grown cells in mineralizing pyrene (Fig. 2). Likewise, Molina et al. observed that when *Mycobacterium* strains were exposed to phenanthrene, *de novo* protein synthesis was not required for rapid mineralization of pyrene (31). In addition, a majority of the pyrene-specific proteins found in strain 6PY1 were similar in sequence to enzymes responsible for phenanthrene degradation in *Nocardioides* strain KP7 (Table 2). Furthermore, it is remarkable that most



TABLE 3. Production of pyrene and phenanthrene dihydrodiols by *E. coli* strains overproducing the two dioxygenases from *Mycobacterium* sp. strain 6PY1<sup>a</sup>

Strain	Gene product(s)	Concn of phenanthrene <i>cis</i> -3,4-dihydrodiol (ppm) <sup>b</sup>	Concn of phenanthrene <i>cis</i> -9,10-dihydrodiol (ppm) <sup>b</sup>	Concn of pyrene <i>cis</i> -4,5-dihydrodiol (ppm) <sup>b</sup>
BL21AI(pSKU06)	Pdo1	0.135	0.317	0.415
BL21AI(pSKU09)	Pdo2	0.913	0.00074	0.00893
BL21AI(pSKU06)(pBRCD)	Pdo1 and PhdCD	0.0875	0.165	0.288
BL21AI(pSKU09)(pBRCD)	Pdo2 and PhdCD	5.80	0.00164	0.0187

<sup>a</sup> The amount of PAH added to cultures was equivalent to 25 mg/liter of aqueous medium.

<sup>b</sup> The concentrations of dihydrodiols in the growth medium were determined after 6 h of incubation in the presence of the respective PAHs, as described in Materials and Methods. The GC retention times of the TMS derivatives were 18.4 min for phenanthrene *cis*-3,4-dihydrodiol, 17.5 min for phenanthrene *cis*-9,10-dihydrodiol, and 20.5 min for pyrene *cis*-4,5-dihydrodiol.

bacterial strains able to grow on pyrene that have been described so far were also found to metabolize phenanthrene (2, 4, 7, 19, 21, 37, 40). The fact that the metabolisms of phenanthrene and pyrene share common enzymes is also consistent with the current knowledge of the catabolic pathways of these PAHs (Fig. 1). From the identification of the metabolites produced by various pyrene degraders, essentially *Mycobacterium* species, it was established that pyrene was initially hydroxylated on the C4 and C5 positions, followed by dehydrogenation and *ortho* cleavage to give phenanthrene 4,5-dicarboxylic acid (7, 15, 37, 39). This intermediate is further transformed to 3,4-dihydroxyphenanthrene, which is subsequently decomposed to phthalic acid through the action of enzymes known to be involved in phenanthrene degradation (6, 7). It is likely that strain 6PY1 decomposes pyrene through the same succession of reaction steps because the key intermediate metabolites have been identified in pyrene-grown cultures (Willison, unpublished). Moreover, we have identified, on the basis of sequence similarities, four of the seven enzymes responsible for the conversion of 3,4-dihydroxyphenanthrene to phthalic acid, i.e., proteins P13, P15, P18, and P22 (Fig. 1 and Table 2). The question arises of whether the set of enzymes responsible for phenanthrene degradation is sufficient to metabolize pyrene or whether additional enzymes are required, especially for the initial steps of pyrene degradation. We have identified two

ring-hydroxylating dioxygenases, one of which likely initiates the oxidative degradation of pyrene. We have demonstrated that either enzyme could convert this PAH into the corresponding 4,5-dihydrodiol. However, given the fact that the recombinant Pdo1 enzyme showed considerably greater activity than Pdo2 in this reaction, the former enzyme probably plays a major role in the oxidative attack of pyrene.

The second step would be catalyzed by a dihydrodiol dehydrogenase. An enzyme of such type was detected in phenanthrene-grown cells, but we do not know whether this enzyme is also present in pyrene-grown cells and whether it could use pyrene 4,5-dihydrodiol as a substrate. The next three steps, involving *ortho* cleavage of 4,5-dihydroxypyrene, decarboxylation of 4,5-phenanthrene dicarboxylic acid, and dihydroxylation of 4-phenanthroic acid, are catalyzed by unknown enzymes. Perhaps components of such enzymes might be found among the pyrene-specific polypeptides which remain to be identified (Fig. 3 and 4; Table 2). Alternatively, we might have failed to detect some of these enzymes due to limitations of the approach employed based on 2D-PAGE analysis. Especially, proteins of interest could have passed undetected if they were membrane bound or synthesized at very low levels. This is probably the case for the reductase and the ferredoxin, which are expected to associate with the Pdo1 and Pdo2 terminal components to form active dioxygenase complexes.

The present study demonstrates that the biosynthesis of the catabolic enzymes responsible for PAH degradation in strain 6PY1 is under strict metabolic control. In acetate-grown cells, no pyrene mineralization activity was detected and many proteins identified as PAH catabolic enzymes were absent. Likewise, pyrene degradation enzymes were found to be inducible in *Mycobacterium* strain PYR-1 (14). Several enzymes involved in PAH degradation, including Pdo1 and proteins which appear to be specific to the catabolism of phenanthrene (proteins P13, P15, P18, and P22), were biosynthesized at high levels in benzoate-grown cells (Fig. 4D). This result suggested that the synthesis of these enzymes is induced by a metabolite formed upon degradation of aromatic hydrocarbons rather than by PAHs. A few polypeptides, including the two subunits of Pdo2, were synthesized only in the presence of a PAH, indicating that they are subjected to a regulation mechanism different from that controlling the enzymes induced by benzoate. Finally, we observed that some polypeptides were detectable only in pyrene-induced cells and that other proteins, including a dihydrodiol dehydrogenase, were found exclusively or predomi-

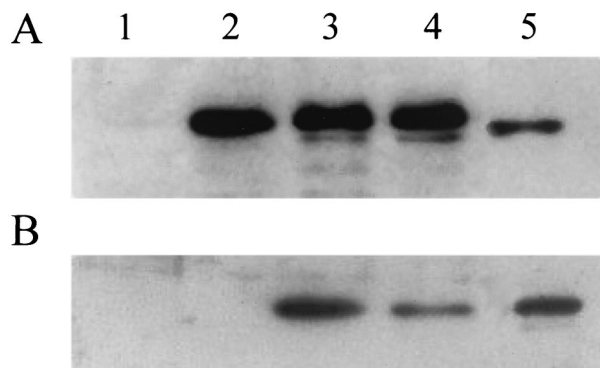


FIG. 8. Immunoblot detection of Pdo1 and Pdo2 in cell extracts of strain 6PY1. Lanes were loaded with the same amounts of cell proteins prepared from bacteria grown on acetate (lane 1), benzoate (lane 2), phenanthrene (lane 3), and pyrene (lane 4). After separation by SDS-PAGE and electrotransfer onto nitrocellulose, proteins were immunodetected by using either anti-Pdo1 $\alpha$  (A) or anti-Pdo2 $\alpha$  (B) polyclonal antibodies. Lane 5 was loaded with 0.4  $\mu$ g of Pdo2.

nantly in phenanthrene-grown cells. Hence, the synthesis of PAH catabolic enzymes appears to involve several regulatory mechanisms which remain to be elucidated in future studies.

The two dioxygenase terminal components described herein were found to be related to enzymes found in four actinomycete species, including two *Rhodococcus* strains (27, 38), *Nocardioide*s strain KP7 (34), and *Mycobacterium* strain PYR-1 (24). In previous reports, phylogenetic analysis indicated that these dioxygenases formed a cluster of enzymes distinct from other dioxygenases (24, 34). Hence, the Pdo1 and Pdo2 enzymes from strain 6PY1 are two new members of the same phylogenetic group. As judged from in vivo activity assays, the two dioxygenases showed markedly different selectivities towards pyrene and phenanthrene. Pdo1 converted pyrene to pyrene *cis*-4,5-dihydrodiol much more efficiently than did Pdo2, whereas the latter enzyme displayed higher activity in the oxidation of phenanthrene. It might be inferred that in strain 6PY1 the initial attack of each PAH substrate involved a specialized enzyme, Pdo1 for pyrene and Pdo2 for phenanthrene. Interestingly, the dioxygenase most similar to Pdo1 was shown to oxidize pyrene (24), whereas the enzyme with closest similarity to Pdo2 was described as a phenanthrene dioxygenase (34). The Pdo2-catalyzed oxidation of phenanthrene yielded almost exclusively the 3,4-dihydrodiol, which is the natural substrate of the *cis*-dihydrodiol dehydrogenase, consistent with the current pathway of phenanthrene degradation (Fig. 1). Pdo1 also generated 9,10-dihydroxyphenanthrene, which is probably not metabolized further. This metabolite, but not the 3,4-dihydrodiol, was detected in the culture medium of strain 6PY1 growing on phenanthrene (unpublished results), indicating that it is probably formed as a dead-end product, mainly as a result of Pdo1 activity.

As for other ring-hydroxylating dioxygenases, Pdo1 and Pdo2 certainly require electron carrier proteins for catalysis, namely an NAD(P)H reductase and a ferredoxin. Since those recombinant enzymes showed detectable activity in vivo, electron carriers from *E. coli* certainly replace at least partially the dioxygenase-specific electron carriers. Likewise, the terminal dioxygenase components from *Burkholderia* sp. strain RP007 (28), *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9 (30), *Rhodococcus* sp. strain 19070 (12), and *Terrabacter* sp. strain DBF63 (23) were found to be active in *E. coli* with the complementation of nonspecific ferredoxin and reductase components from the host. On the other hand, the dioxin dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1 was active in *E. coli* only when the appropriate electron carrier proteins were simultaneously expressed (1). As for the two dioxygenase components described in this study, the source of reductant provided by *E. coli* was probably suboptimal, as judged from the stimulation of Pdo2 catalytic activity observed in the recombinant strain coexpressing the PhdC and PhdD electron carriers from strain KP7. Further characterization of the Pdo1 and Pdo2 enzymes from strain 6PY1 will require identification of their cognate electron carrier proteins.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Harayama for providing plasmid pHA171.

This work was supported in part by a grant from the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie and by grants from the

Centre National de la Recherche Scientifique and the Commissariat à l'Energie Atomique.

#### REFERENCES

- Armengaud, J., B. Happe, and K. N. Timmis. 1998. Genetic analysis of dioxin dioxygenase of *Sphingomonas* sp. strain RW1: catabolic genes dispersed on the genome. *J. Bacteriol.* **180**:3954–3966.
- Boldrin, B., A. Tiehm, and C. Fritzsche. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1927–1930.
- Boonchan, S., M. L. Britz, and G. A. Stanley. 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.* **59**:482–494.
- Bouchez, M., D. Blanchet, and J. P. Vandecasteele. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:156–164.
- Cerletti, P. 1986. Seeking a better job for an under-employed enzyme: rhodanese. *Trends Biochem. Sci.* **11**:369–372.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**:351–368.
- Dean-Ross, D., and C. E. Cerniglia. 1996. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**:307–312.
- Ensley, B. D., and D. T. Gibson. 1983. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. *J. Bacteriol.* **155**:505–511.
- Ferro, M., D. Seigneurin-Berny, N. Rolland, A. Chapel, D. Salvi, J. Garin, and J. Joyard. 2000. Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* **21**:3517–3526.
- Gonzalez-y-Merchand, J. A., I. Estrada-Garcia, M. J. Colston, and R. A. Cox. 1996. A novel method for the isolation of mycobacterial DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:71–77.
- Görg, A., W. Postel, and S. Gunther. 1988. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9**:531–546.
- Haddad, S., D. M. Eby, and E. L. Neidle. 2001. Cloning and expression of the benzoate dioxygenase genes from *Rhodococcus* sp. strain 19070. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2507–2514.
- Haddock, J. D., and D. T. Gibson. 1995. Purification and characterization of the oxygenase component of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *J. Bacteriol.* **177**:5834–5839.
- Heitkamp, M. A., W. Franklin, and C. E. Cerniglia. 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2549–2555.
- Heitkamp, M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller, and C. E. Cerniglia. 1988. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2556–2565.
- Iwabuchi, T., and S. Harayama. 1998. Biochemical and genetic characterization of trans-2'-carboxybenzalpyruvate hydratase-aldolase from a phenanthrene-degrading *Nocardioide*s strain. *J. Bacteriol.* **180**:945–949.
- Iwabuchi, T., and S. Harayama. 1998. Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioide*s sp. KP7. *J. Biol. Chem.* **273**:8332–8336.
- Jouanneau, Y., C. Meyer, I. Naud, and W. Klipp. 1995. Characterization of an *fdxN* mutant of *Rhodobacter capsulatus* indicates that ferredoxin I serves as electron donor to nitrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1232**:33–42.
- Juhász, A. L., M. L. Britz, and G. A. Stanley. 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* **83**:189–198.
- Kanally, R. A., and S. Harayama. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* **182**:2059–2067.
- Kastner, M., M. Breuer-Jammali, and B. Mahro. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:267–273.
- Kastner, M., M. Breuer-Jammali, and B. Mahro. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:359–362.
- Kasuga, K., H. Habe, J. S. Chung, T. Yoshida, H. Nojiri, H. Yamane, and T. Omori. 2001. Isolation and characterization of the genes encoding a novel oxygenase component of angular dioxygenase from the Gram-positive dibenzofuran-degrader *Terrabacter* sp. strain DBF63. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**:195–204.
- Khan, A. A., R. F. Wang, W. W. Cao, D. R. Doerge, D. Wennerstrom, and C. E. Cerniglia. 2001. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3577–3585.
- Kosono, S., M. Maeda, F. Fuji, H. Arai, and T. Kudo. 1997. Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a ter-

- mite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3282–3285.
26. Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop II, and K. M. Peterson. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBRR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175–176.
  27. Larkin, M. J., C. C. Allen, L. A. Kulakov, and D. A. Lipscomb. 1999. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain NCIMB12038. *J. Bacteriol.* **181**:6200–6204.
  28. Laurie, A. D., and G. Lloyd-Jones. 1999. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J. Bacteriol.* **181**:531–540.
  29. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265–275.
  30. Martin, V. J. J., and W. W. Mohn. 1999. A novel aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase from the diterpenoid-degrading bacterium *Pseudomonas abietaniphila* BKME-9. *J. Bacteriol.* **181**:2675–2682.
  31. Molina, M., R. Araujo, and R. E. Hodson. 1999. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. *Can. J. Microbiol.* **45**:520–529.
  32. Parales, R. E., K. Lee, S. M. Resnick, H. Y. Jiang, D. J. Lessner, and D. T. Gibson. 2000. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *J. Bacteriol.* **182**:1641–1649.
  33. Pearson, W. R., and D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444–2448.
  34. Saito, A., T. Iwabuchi, and S. Harayama. 2000. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**:2134–2141.
  35. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  36. Schagger, H., and G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368–379.
  37. Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, and D. Warshawsky. 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:13–19.
  38. Treadway, S. L., K. S. Yanagimachi, E. Lankenau, P. A. Lessard, G. Stephanopoulos, and A. J. Sinskey. 1999. Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:786–793.
  39. Vila, J., Z. Lopez, J. Sabate, C. Minguillon, A. M. Solanas, and M. Grifoll. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5497–5505.
  40. Walter, U., M. Beyer, J. Klein, and H.-J. Rehm. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:671–676.
  41. Wilson, S. C., and K. C. Jones. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* **81**:229–249.
  42. Yen, K. M., and C. M. Serdar. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **15**:247–268.

## SUMMARY

This thesis deals with the bacterial biodegradation of pollutants called polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The bacterium *Mycobacterium* sp. 6PY1 was isolated from a polluted soil for its ability to use pyrene, a 4-ring PAH, as sole source of carbon and energy. To learn about the pyrene metabolic pathway, the identification of the enzymes involved in this process has been undertaken using a proteomic approach. This approach revealed the occurrence of two ring-hydroxylating dioxygenases in strain 6PY1, which could catalyze the initial attack of pyrene.

The goal of this study was to clone the genes encoding the dioxygenases identified in *Mycobacterium* sp. 6PY1, over-express these genes in an heterologous system in order to facilitate the purification of the corresponding enzymes, and determine the biochemical and catalytic properties of these enzymes. The *pdoA1B1* genes encoding the terminal component of a dioxygenase were cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. The catalytic properties of this enzyme, called Pdo1, were determined *in vivo* by measuring the oxidation products of 2- to 4-ring PAHs by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Analysis of the selectivity of the enzyme, as determined using GC-MS, showed that Pdo1 preferentially oxidized 3- or 4-ring PAHs, including phenanthrene and pyrene, but was inactive on diaromatic compounds such as naphthalene and biphenyl. Pdo1 was unstable and was therefore purified in inactive form.

The genes encoding a second dioxygenase component were found in a locus containing two other catabolic genes. The *pdoA2B2* genes encoded an enzyme called Pdo2 showing a narrow specificity towards 2- to 3-ring PAHs, and a high preference for phenanthrene. Pdo2 is an  $\alpha_3\beta_3$  hexamer, containing [2Fe-2S] Rieske clusters which confer it a characteristic absorbance spectrum. A third set of genes possibly encoding another dioxygenase was discovered in the genome of *Mycobacterium* sp. 6PY1. This set is closely similar in sequence to that encoding Pdo1, suggesting that both isoenzymes are able to oxidize pyrene. In order to function, the ring-hydroxylating dioxygenases require two electron-transfer proteins : a ferredoxin and a reductase. The electron carriers associated to Pdo1 and Pdo2 were not identified. However, the activity of the two dioxygenases was stimulated *in vivo* by co-expressing accessory genes recruited from other bacteria. Finally, immunodetection experiments using specific antibodies showed that the enzymes Pdo1 and Pdo2 were co-induced in the presence of PAHs, but differentially regulated according to growth conditions.

**Key-words** : Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Biodegradation, *Mycobacterium*, Dioxygenase, Ferredoxin, Reductase, *pdo* genes, Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)



## RESUME

Cette thèse traite de la biodégradation par les bactéries d'une catégorie de polluants appelés hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP. La bactérie *Mycobacterium* sp. 6PY1 a été isolée d'un sol pollué pour sa capacité à utiliser un HAP à 4 cycles, le pyrène, comme seule source de carbone et d'énergie. Pour comprendre comment le pyrène est métabolisé, l'identification des enzymes impliquées a été entreprise par une approche protéomique. Cette approche a notamment mis en évidence dans la souche 6PY1 deux arène dioxygénases, enzymes susceptibles de catalyser l'attaque initiale du pyrène.

L'objectif de cette étude consistait à cloner les gènes de structure des arène dioxygénases identifiées chez *Mycobacterium* 6PY1, à surexprimer ces gènes en système hétérologue pour faciliter la purification des enzymes correspondantes, et à déterminer les propriétés biochimiques et catalytiques de ces enzymes. Les gènes *pdoA1B1* codant la composante terminale d'une dioxygénase ont été clonés et surexprimés chez *E. coli*. Les propriétés catalytiques de cette enzyme, appelée Pdo1, ont été déterminées *in vivo* en dosant les produits d'oxydation de HAP composés de 2 à 4 cycles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM). L'analyse de la sélectivité de l'enzyme, déterminée de cette façon montre que Pdo1 oxyde préférentiellement des HAP à 3 ou 4 cycles, comme le phénanthrène et le pyrène, mais n'attaque pas les di-aromatiques comme le naphthalène et le biphenyle. La protéine Pdo1 s'est révélée instable et n'a été purifiée que sous forme inactive.

Les gènes de structure d'une seconde composante dioxygénase ont été repérés dans un locus comportant deux autres gènes cataboliques. Les gènes *pdoA2B2* codent pour une enzyme, appelée Pdo2, montrant une spécificité étroite vis-à-vis des HAP à 2 ou 3 cycles aromatiques et une nette préférence pour le phénanthrène. La protéine Pdo2 purifiée est un hexamère de type  $\alpha_3\beta_3$ , possédant des centres [2Fe-2S] de type Rieske qui lui confèrent un spectre d'absorbance caractéristique. Des gènes susceptibles de coder pour une troisième dioxygénase ont été découverts dans le génome de *Mycobacterium* sp. 6PY1. Ces gènes sont très proches en séquence de ceux codant pour Pdo1, suggérant que la bactérie synthétise deux iso-enzymes capables d'oxyder le pyrène. Le fonctionnement des arène dioxygénases requiert deux protéines transporteurs d'électrons de type ferrédoxine et réductase. Celles qui sont associées aux enzymes Pdo1 et Pdo2 n'ont pas été identifiées. Cependant, l'activité des deux dioxygénases de la souche 6PY1 a été stimulée *in vivo* en co-exprimant dans *E. coli* des gènes accessoires recrutés d'autres bactéries. Enfin, des expériences d'immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques ont montré que les enzymes Pdo1 et Pdo2 sont co-induites en présence de HAP mais ne sont pas régulées de la même manière en fonction des conditions de croissance.

**Mots-clés** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), Biodégradation, *Mycobacterium*, Dioxygénase, Ferrédoxine, Réductase, Gènes *pdo*, Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).